



MARINA PEREIRA COLELLA

**ESTUDO DO ESTADO DE
HIPERCOAGULABILIDADE NA DOENÇA
FALCIFORME**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARINA PEREIRA COLELLA

ESTUDO DO ESTADO DE HIPERCOAGULABILIDADE
NA DOENÇA FALCIFORME

Dissertação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabíola Traina
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Erich Vinicius de Paula

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR MARINA
PEREIRA COLELLA, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. FABÍOLA TRAINA.



CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C676e Colella, Marina Pereira, 1981-
Estudo do estado de hipercoagulabilidade na doença falciforme / Marina
Pereira Colella. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Fabíola Traina.
Coorientador: Erich Vinícius de Paula.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Doença da hemoglobina SC. 3. Hidroxiureia. 4.
Hipercoagulabilidade. 5. Inflamação. I. Traina, Fabíola. II. Paula, Erich Vinícius de.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the hypercoagulability state in sickle cell disease

Palavras-chave em inglês:

Anemia, Sickle cell
Hemoglobin SC Disease
Hydroxyurea
Hypercoagulability
Inflammation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Fabíola Traina [Orientador]
Vania Maris Morelli
Maria Stella Figueiredo
Simone Cristina Olenscki Gilli
Lício Augusto Velloso

Data de defesa: 22-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARINA PEREIRA COLELLA

ORIENTADORA: PROF. DR. FABÍOLA TRAINA

COORIENTADOR: PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS:

1. PROF. DR. FABÍOLA TRAINA



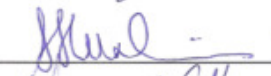
2. PROF. DR. VANIA MARIS MORELLI



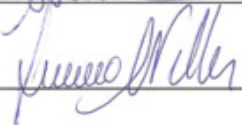
3. PROF. DR. MARIA STELLA FIGUEIREDO



4. PROF. DR. SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI



5. PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22 de outubro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, aos quais tudo devo.

Ao meu marido, Marcos, pelo apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Fabíola, que depositou tanta confiança em mim. Muito obrigada pela amizade, pelo apoio irrestrito em todas as etapas deste projeto, por todo incentivo a minha formação profissional, e pela orientação que ultrapassa a tese.

Ao Erich, pelo apoio, amizade, e pelas valiosas discussões ao longo de todo projeto, sempre contribuindo com ideias enriquecedoras.

À Dra Nicola, pelo apoio e colaboração.

À Camila, por toda ajuda no projeto dos camundongos.

Aos professores Dra Joyce, Dra Sara e Dr Fernando por terem apoiado este projeto.

Aos funcionários do laboratório de hemostasia, em especial a Susan, e aos colegas do laboratório de biologia molecular, em especial o João, por toda ajuda.

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio ao longo de toda esta trajetória.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP (projeto 2009/16488-7), CNPq (projeto 481550/2011-9), e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCT Sangue/CNPq) (projeto 2008/57895-1).

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é caracterizada pela presença de crises vaso-oclusivas e hemólise intravascular com consequente depleção de óxido nítrico, ativação endotelial e inflamação crônica. Praticamente todos os elementos da coagulação estão alterados na direção pró-coagulante na AF, de forma que uma incidência aumentada de eventos tromboembólicos tem sido descrita nesta doença. A hidroxiuréia é atualmente um dos pilares do tratamento destes pacientes, tendo como principal ação induzir um aumento da hemoglobina fetal. A hemoglobinopatia SC (HbSC) é a segunda hemoglobinopatia mais prevalente após a AF. Sabe-se que há uma incidência elevada de eventos tromboembólicos na HbSC, porém conhece-se muito pouco sobre a ativação da coagulação nesta doença.

O presente estudo foi dividido em duas partes, tendo dois objetivos principais: (1) testar a hipótese de que a hidroxiuréia teria um efeito benéfico no estado de hipercoagulabilidade visto na AF; (2) avaliar o estado de hipercoagulabilidade presente na HbSC. Na primeira parte do estudo avaliamos a ação da hidroxiuréia nos principais componentes do balanço hemostático em pacientes com AF tratados (SS-HU) ou não (SS) com hidroxiureia; e estudamos o efeito da hidroxiureia na ativação final da coagulação em um modelo murino de AF incapaz de expressar a hemoglobina fetal. Nossos resultados mostraram que o tratamento com hidroxiuréia esteve associado com melhora dos marcadores de ativação da coagulação, incluindo redução na expressão gênica de fator tecidual (FT) (5.0[SS] vs. 2.6[SS-HU], $p=0.02$) e diminuição nos níveis plasmáticos de FT ($p=0.01$), complexo trombina-antitrombina III (TAT) (11.5[SS] vs. 7.5[SS-HU],

$p=0.03$) e fragmento 1+2 da protrombina (301.5[SS] vs. 245[SS-HU], $p=0.09$). Os pacientes tratados com hidroxiuréia também apresentaram reduções significativas dos níveis de trombomodulina solúvel (3.6[SS] vs. 2.5[SS-HU], $p=0.0007$) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (2.7[SS] vs. 0.3[SS-HU], $p<0.0001$). A redução dos marcadores de hipercoagulabilidade apresentou correlações significativas com o aumento da HbF e reduções dos marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação. Em modelo murino de AF, a hidroxiuréia resultou em diminuição dos níveis plasmáticos de TAT (138.5[salina] vs. 106.7[HU], $p=0.05$). Esses resultados fornecem evidências de um efeito benéfico da hidroxiuréia em reduzir o estado de hipercoagulabilidade na AF.

Na segunda parte do presente estudo, nós avaliamos os diversos componentes do balanço hemostático nos pacientes com HbSC e comparamos com os pacientes AF (SS e SS-HU). A comparação dos marcadores de hipercoagulabilidade entre pacientes HbSC e AF revelou que a expressão gênica do *FT* foi semelhante ao encontrado na AF (2.6[SC] vs. 3.1[SS+SS-HU], $p=0.2$), enquanto os níveis de TAT e D-dímero foram inferiores (TAT: 4.2[SC] vs. 7.4[SS+SS-HU], $p<0.0001$; D-dímero: 710.4[SC] vs. 1495[SS+SS-HU], $p=0.0003$). Em comparação com pacientes com AF, os pacientes com HbSC apresentaram níveis semelhantes de trombomodulina solúvel (3.2[SC] vs. 3.0[SS+SS-HU], $p=0.6$), TNF- α (2.7[SC] vs. 2.2[SS+SS-HU], $p=0.5$), e níveis inferiores de interleucina 8 (2.5[SC] vs. 3.2[SS+SS-HU], $p=0.05$). Dentre os pacientes com HbSC os marcadores de hipercoagulabilidade também apresentaram correlações significativas com marcadores de hemólise e inflamação.

Em conclusão, nossos resultados fornecem evidências de um efeito benéfico da hidroxiuréia em reduzir o estado de hipercoagulabilidade na AF e demonstram que existe uma ativação da coagulação na HbSC quando comparados a indivíduos normais, porém não tão intensa quanto a vista na AF.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is characterized by the presence of vaso-occlusive crises and intravascular hemolysis with consequent depletion of nitric oxide, endothelial activation and chronic inflammation. Virtually all of the components of coagulation are altered in the procoagulant direction in sickle cell anemia, and thus an increased incidence of thromboembolic events has been described in this disease. Hydroxyurea is currently one of the mainstays of treatment of these patients, with the primary action of inducing an increase in fetal hemoglobin. Hemoglobin SC disease is the second most prevalent hemoglobinopathy after sickle cell anemia. There is a high incidence of thromboembolic events in hemoglobin SC disease, but very little is known about the activation of coagulation in this disease.

This study was divided into two parts, with two main objectives: (1) test our hypothesis that hydroxyurea would have a beneficial effect on the hypercoagulable state seen in sickle cell anemia; (2) evaluate the hypercoagulable state present in hemoglobin SC disease. In the first part of this study we evaluated the effect of hydroxyurea in the main components of the hemostatic balance of sickle cell anemia patients treated (SS-HU) or not (SS) with the drug; and we also evaluated the effect of hydroxyurea on thrombin generation in a sickle cell murine model, incapable of expressing fetal hemoglobin. Our results showed that treatment with hydroxyurea was associated with reduced markers of coagulation activation, including a reduction in the expression of the tissue factor gene (5.0[SS] vs. 2.6[SS-HU], $p=0.02$) and in plasma levels of tissue factor ($p=0.01$), thrombin-antithrombin complex III (TAT) (11.5[SS] vs. 7.5[SS-HU], $p=0.03$), and prothrombin

fragment 1+2 (301.5[SS] vs. 245[SS-HU], $p=0.09$). Patients treated with hydroxyurea also presented reductions in the levels of soluble thrombomodulin (3.6[SS] vs. 2.5[SS-HU], $p=0.0007$) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (2.7[SS] vs. 0.3[SS-HU], $p<0.0001$). Hypercoagulability markers presented significant correlations with the increase in fetal hemoglobin levels and reductions in hemolysis, endothelial activation and inflammation markers. In the murine model of sickle cell anemia hydroxyurea resulted in reduction of plasma levels of TAT (138.5[saline] vs. 106.7[HU], $p=0.05$). These results provide evidence that treatment with hydroxyurea has a beneficial effect of reducing the hypercoagulability state seen in sickle cell anemia.

In the second part of this study, we studied the various components of the hemostatic balance in hemoglobin SC disease patients and compared them with sickle cell anemia patients (SS and SS-HU). The gene expression of tissue factor was similar to the expression seen in sickle cell anemia (2.6[SC] vs. 3.1[SS+SS-HU], $p=0.2$), while the levels of TAT and D-dimer were lower (TAT: 4.2[SC] vs. 7.4[SS+SS-HU], $p<0.0001$; D-dimer: 710.4[SC] vs. 1495[SS+SS-HU], $p=0.0003$). In comparison to patients with sickle cell anemia, patients with hemoglobin SC disease presented similar levels of soluble thrombomodulin (3.2[SC] vs. 3.0[SS+SS-HU], $p=0.6$), TNF- α (2.7[SC] vs. 2.2[SS+SS-HU], $p=0.5$), and lower levels of interleukin 8 (2.5[SC] vs. 3.2[SS+SS-HU], $p=0.05$). In hemoglobin SC patients, the hypercoagulability markers presented significant correlations with hemolysis and inflammation markers.

In conclusion, our results provide evidence that treatment with hydroxyurea has a beneficial effect of reducing the hypercoagulability state seen in sickle cell anemia, and that there is an activation of coagulation in hemoglobin SC disease when compared to normal individuals, but not as intense as seen in sickle cell anemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia falciforme
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
CECs	Células endoteliais circulantes
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
DD	D-dímero
DF	Doença falciforme
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FT	Fator tecidual
FWV	Fator de von Willebrand
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Hemoglobinopatia SC
HUVECs	Células endoteliais de veias umbilicais humanas
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

LDH	Lactato desidrogenase
NO	Óxido nítrico
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
ΔRn	Delta do repórter normalizado
SS	Pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia
SS-HU	Pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia
TAT	Complexo trombina-antitrombina III
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TEV	Tromboembolismo venoso
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TVP	Trombose venosa profunda
VCAM	Molécula de adesão de células vasculares

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Par de iniciadores do gene do <i>fator tecidual</i>	61
Tabela 2 – Sequência dos iniciadores dos controles endógenos	65
Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.....	77
Tabela 4 – Resultados da expressão do <i>fator tecidual</i> , marcadores de coagulação, ativação endotelial e inflamação nos controles e pacientes.....	87
Tabela 5 – Correlações do <i>fator tecidual</i> e marcadores da coagulação com marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação....	89
Tabela 6 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.....	94
Tabela 7 – Resultados da expressão do <i>fator tecidual</i> , marcadores de coagulação, ativação endotelial e inflamação nos controles e pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme.....	108
Tabela 8 – Correlações dos marcadores da coagulação com marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação na hemoglobinopatia SC.....	110

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquema ilustrando de forma simplificada a geração de trombina e seus marcadores.....	35
Figura 2 – Curva de amplificação do gene do <i>fator tecidual</i> nas concentrações crescentes do par de iniciadores.....	63
Figura 3 – Curva de dissociação dos iniciadores, demonstrando sua especificidade.....	63
Figura 4 – Curva de eficiência do par de iniciadores do gene do <i>fator tecidual</i>	64
Figura 5 – Teste de compatibilidade entre o gene do <i>fator tecidual</i> e o controle endógeno β -Actina.....	66
Figura 6 – Expressão relativa do <i>fator tecidual</i> nos pacientes com anemia falciforme e controles.....	79
Figura 7 – Níveis plasmáticos do fator tecidual nos pacientes com anemia falciforme e controles.....	81
Figura 8 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com anemia falciforme e controles.....	82
Figura 9 – Níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina nos pacientes com anemia falciforme e controles.....	83

Figura 10 – Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel nos pacientes com anemia falciforme e controles.....	84
Figura 11 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com anemia falciforme e controles.....	86
Figura 12 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em modelo murino de anemia falciforme.....	90
Figura 13 – Níveis plasmáticos da interleucina 6 em modelo murino de anemia falciforme.....	91
Figura 14 – Níveis plasmáticos da sVCAM-1 em modelo murino de anemia falciforme.....	92
Figura 15 – Expressão relativa do <i>fator tecidual</i> nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	95
Figura 16 – Expressão relativa do <i>fator tecidual</i> nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com ou sem uso de hidroxiuréia.....	96
Figura 17 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	97
Figura 18 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com ou sem uso de hidroxiuréia.....	98

Figura 19 – Níveis plasmáticos do D-dímero em pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	99
Figura 20 – Níveis plasmáticos do D-dímero em pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia.....	100
Figura 21 – Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	101
Figura 22 – Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia.....	102
Figura 23 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	103
Figura 24 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia.....	104
Figura 25 – Níveis séricos da interleucina 8 nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.....	105
Figura 26 – Níveis séricos da interleucina 8 nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia.....	106
Figura 27 – Hipóteses sobre a ação da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme.....	122

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	31
1.1. Fisiopatologia da anemia falciforme.....	33
1.2. Regulação do balanço hemostático	34
1.3. Evidências clínicas de hipercoagulabilidade na anemia falciforme..	36
1.4. Mecanismos que levam à hipercoagulabilidade na anemia falciforme.....	39
A. Disfunção endotelial.....	39
B. Inflamação.....	42
C. Hemólise intravascular.....	44
1.5. Estratégias terapêuticas para reequilíbrio do balanço hemostático na anemia falciforme.....	46
A. Anticoagulantes e antiagregantes plaquetários.....	46
B. Indução da hemoglobina fetal.....	47
C. Hidroxiuréia.....	49
D. Terapia gênica.....	50
1.6. Hipercoagulabilidade na hemoglobinopatia SC.....	50
2. Objetivos.....	53

2.1. Parte 1 – Efeito da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme.....	55
2.2. Parte 2 - Estado de hipercoagulabilidade na hemoglobinopatia SC.....	55
3. Material e métodos.....	57
3.1. Pacientes.....	59
3.2. Coleta de dados clínicos.....	59
3.3. Coleta de dados laboratoriais e preparação das amostras de sangue.....	60
3.4. Quantificação da expressão do fator tecidual.....	61
A. Expressão gênica – PCR quantitativo em tempo real.....	61
B. Expressão proteica.....	67
3.5. Quantificação dos marcadores de geração de trombina.....	67
3.6. Quantificação do marcador de ativação endotelial.....	68
3.7. Quantificação dos marcadores de inflamação.....	68
3.8. Experimentos no modelo murino de anemia falciforme.....	68
3.9. Análises estatísticas.....	70
4. Resultados.....	73
4.1. Parte 1 – Estudo do efeito da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme.....	75
A. Características dos pacientes incluídos.....	75

B.	Expressão relativa do <i>fator tecidual</i>	79
C.	Níveis plasmáticos do fator tecidual.....	80
D.	Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III.....	81
E.	Níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina.....	83
F.	Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel.....	84
G.	Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa.....	85
H.	Correlações dos marcadores da coagulação com os marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação.....	88
I.	Experimentos no modelo murino de anemia falciforme.....	90
4.2.	Parte 2 - Estudo do estado de hipercoagulabilidade na Hemoglobinopatia SC.....	93
A.	Características dos pacientes incluídos.....	93
B.	Expressão relativa do <i>fator tecidual</i>	95
C.	Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III.....	97
D.	Níveis plasmáticos do D-dímero.....	99
E.	Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel.....	101
F.	Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa.....	103
G.	Níveis séricos da interleucina 8.....	105

H.	Correlações dos marcadores da coagulação com os marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação na HbSC.....	109
I.	Associações entre os marcadores da coagulação e complicações clínicas crônicas.....	110
5.	Discussão.....	113
6.	Conclusões.....	127
7.	Referências bibliográficas.....	133
8.	Anexos.....	145
9.	Apêndices.....	151

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiopatologia da anemia falciforme

A anemia falciforme (AF) resulta de uma mutação de ponto no códon 6 da cadeia beta da hemoglobina, onde o 17º nucleotídeo adenina é trocado por timina. Esta mutação gera a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, levando a formação da hemoglobina S (HbS)(Ingram 1958). O evento primário na patogênese da AF é que a HbS é solúvel apenas se oxigenada, quando desoxigenada ela se torna insolúvel e sofre polimerização. Estes polímeros preenchem as hemácias, danificam a sua arquitetura e flexibilidade e levam à desidratação, deformação e falcização das hemácias. Como consequência temos as duas características principais da doença que são as crises vaso-oclusivas e a anemia hemolítica crônica. Os episódios agudos de vaso-oclusão são causados por obstrução da microcirculação por eritrócitos rígidos e deformados e leucócitos, levando a isquemia tecidual. Ao ocorrer a restauração do fluxo sanguíneo a lesão tecidual se agrava pela reperfusão, ocasionando danos oxidativos. A anemia hemolítica intravascular também é causada pela polimerização da HbS. Além da anemia, a hemólise crônica também contribui para o desenvolvimento de uma vasculopatia progressiva, caracterizada por hipertensão pulmonar e sistêmica. A anemia hemolítica e os episódios de vaso-oclusão ocasionam as diversas manifestações clínicas que caracterizam a AF, tais como anemia, crises álgicas, síndrome torácica aguda, osteonecrose, priapismo, hipertensão pulmonar, insuficiência renal, retinopatia, úlceras de perna e alterações cardíacas.

A fisiopatologia da AF é complexa e multisistêmica. Além das crises vaso-oclusivas e da anemia hemolítica existem múltiplas outras alterações

ocorrendo concomitantemente que estão interligadas entre si. Sabe-se que na AF ocorre um estado pró-inflamatório crônico (Platt 2000; Hebbel et al. 2004; Qari et al. 2012), disfunção endotelial crônica (Hebbel et al. 2004; Conran and Costa 2009) e múltiplas alterações pró-coagulantes. Na realidade praticamente todos os elementos da coagulação estão alterados no sentido pró-coagulante e a AF é também um estado crônico de hipercoagulabilidade

1.2. Regulação do balanço hemostático

A formação do coágulo hemostático requer em última instância, a conversão de fibrinogênio em fibrina mediada pela ação da trombina. O agente indutor fisiológico da coagulação *in vivo* é o fator tecidual (FT), que é uma proteína transmembrana encontrada em diversas linhagens celulares do subendotélio (Furie and Furie 2008). De forma simplificada, a inicialização do processo da coagulação ocorre na superfície destas células onde, após a lesão vascular, o FT forma um complexo com o fator VII ativado presente em pequenas quantidades na circulação, ativa o fator X, que então desencadeia a geração de trombina. O processo pode ser dividido em três fases: a inicialização, propagação e finalização (Hoffman 2003). Ao final temos a geração de trombina em grandes quantidades, através de reações na superfície plaquetária. Na etapa final deste processo de geração e degradação da trombina e da fibrina, são formados alguns marcadores considerados marcadores da geração de trombina e da fibrinólise, são eles: o complexo trombina-antitrombina III (TAT), o fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) e o D-dímero (DD) (Figura 1).

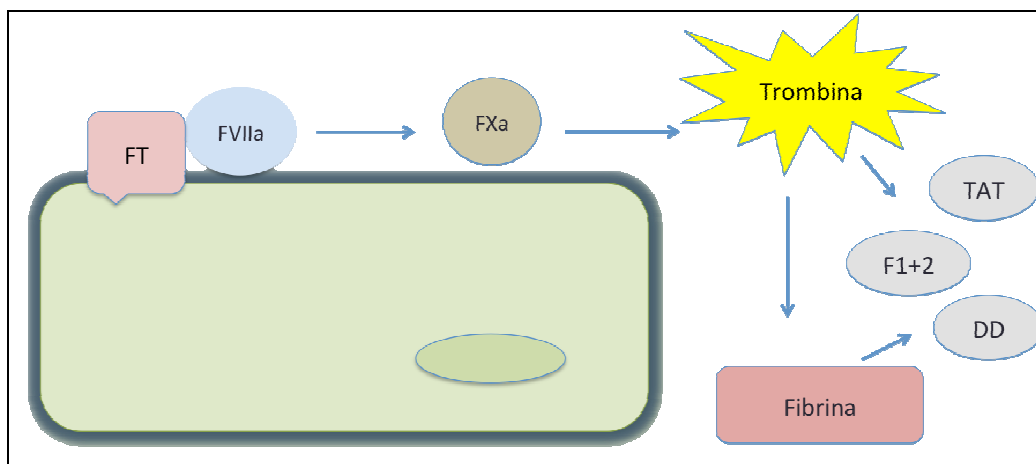


Figura 1 – Esquema ilustrando de forma simplificada a geração de trombina e seus marcadores. O fator tecidual (FT) é o principal iniciador fisiológico da coagulação in vivo. O FT é o receptor celular e cofator do fator VII da coagulação. O complexo TF:FVIIa numa superfície que contenha fosfatidilserina causa ativação do fator X, iniciando uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a formação de trombina e trombo de fibrina. A geração e degradação da trombina e fibrina formadas são mensuradas através do complexo trombina-antitrombina III (TAT), do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) e do D-dímero (DD).

O balanço hemostático depende do equilíbrio entre estes fatores pró-coagulantes e os anticoagulantes naturais e também da restrição do processo às superfícies celulares que normalmente estão separadas pelo endotélio. As reações pró-coagulantes estão localizadas em superfícies celulares específicas, limitando o processo ao local de lesão vascular. O endotélio é o órgão central na manutenção deste equilíbrio, ao separar as células portadoras de FT das plaquetas e fatores da coagulação presentes no

intravascular. É fundamental esta integridade do endotélio como mecanismo de controle, prevenindo uma coagulação disseminada e patológica.

1.3. Evidências clínicas de hipercoagulabilidade na anemia falciforme

Existem inúmeras evidências clínicas indicando a existência de um estado de hipercoagulabilidade na AF. A consequência clínica principal deste estado pró-coagulante é a tendência para os eventos trombóticos, tanto arteriais quanto venosos. O principal exemplo disto é o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), uma importante causa de morbidade e mortalidade em adultos e crianças com AF, chegando a uma prevalência de quase 10% aos 50 anos (Ohene-Frempong et al. 1998). Crianças com AF apresentam uma das maiores taxas de AVCi, com uma incidência de cerca de 240 casos por 100 000 pessoas-ano (Earley et al. 1998), em comparação com a incidência de 2,3 por 100 000 em populações não selecionadas de crianças (Fullerton et al. 2003). Estudos de ressonância magnética mostram que aos 6 anos de idade pelo menos 25% das crianças com AF apresentam infartos cerebrais silenciosos (aparentes apenas na imagem, sem manifestações clínicas) e esta prevalência chega aos 37% aos 14 anos de idade (Bernaudin et al. 2005; Kwiatkowski et al. 2009). Os principais fatores de risco para ocorrência de infartos cerebrais silenciosos em crianças são pressão arterial sistêmica elevada e menores níveis de hemoglobina, indicando que pacientes com maior atividade hemolítica apresentam maior risco de AVCi (DeBaun et al. 2012).

Eventos tromboembólicos venosos também apresentam uma incidência aumentada em pacientes com AF, em especial o tromboembolismo pulmonar (TEP). Em um levantamento de dados de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos, foi encontrada uma prevalência quatro vezes maior de TEP nos pacientes com doença falciforme (DF) (incluindo indivíduos com AF e hemoglobinopatia SC), em comparação com os demais pacientes (Stein et al. 2006). Durante o período de observação (1979-2003) a prevalência de TEP nos indivíduos com AF abaixo dos quarenta anos de idade foi de 0,44%, em comparação com 0,12% nos pacientes afro-descendentes desta faixa etária sem AF. A prevalência de trombose venosa profunda (TVP) foi similar nos dois grupos. Em um segundo estudo americano, a incidência de TEP foi 50-100 vezes maior na população hospitalizada com DF em comparação com a população geral (Novelli et al. 2012). Estudos de autópsia em pacientes com AF demonstraram a presença de trombos novos e velhos na circulação pulmonar em 25 a 60% dos pacientes (Oppenheimer and Esterly 1971; Haupt et al. 1982; Mancini et al. 2003). O TEP é uma importante complicação clínica na AF, sendo considerada a principal causa de óbito associada à síndrome torácica aguda (Vichinsky et al. 2000). A síndrome torácica aguda é uma complicação clínica caracterizada por dor torácica podendo ser acompanhada por febre, hipoxemia, tosse e alterações na radiografia de tórax. O diagnóstico da síndrome torácica aguda é sintomático, e dentre as etiologias possíveis estão o TEP, microinfartos, embolia gordurosa e infecções.

A AF também é considerada um fator de risco significativo para a ocorrência de tromboembolismo relacionado à gestação, com um odds ratio de 6,7 (James et al. 2006).

Indivíduos com traço falciforme também têm um risco aumentado para eventos tromboembólicos (Austin et al. 2007). Em comparação com o grupo controle (afro-americanos hospitalizados sem traço), a incidência de tromboembolismo venoso (TEV) foi duas vezes maior nos afro-americanos com traço falciforme (odds ratio de 1,8, intervalo de confiança de 95% 1,2-2,9). O risco de TEP foi quatro vezes maior (odds ratio de 3,9, intervalo de confiança de 95% 2,2-6,9) e o de TVP não foi significativamente diferente entre os dois grupos. De acordo com estimativas do estudo, a proporção de TEV nos afro-americanos atribuível ao traço falciforme foi de cerca de 7%. Este é um efeito mais importante do que o efeito da mutação da protrombina ou fator V de Leiden na população branca. Ao compararmos os dados deste estudo com os do estudo caso-controle MEGA, grande estudo populacional holandês de fatores de risco de TEV, a presença do traço falciforme se associou a um odds ratio de 3,9 para TEP em comparação com um odds ratio de 1,7 para o fator V de Leiden e de 2,3 para a mutação da protrombina (van Stralen et al. 2008; van Langevelde et al. 2012). A grande implicação dos achados deste estudo é o reconhecimento de que o traço falciforme e a AF/DF são uma forma importante de trombofilia hereditária na população afro-descendente.

Além da incidência aumentada de eventos trombóticos, acredita-se que o estado de hipercoagulabilidade da AF contribua para um espectro de complicações ligadas à hemólise e disfunção endotelial, tais como a

hipertensão pulmonar, o priapismo e as úlceras de membros inferiores (Morris 2008). Parece haver uma relação entre a ativação hemostática e o desenvolvimento da vasculopatia de hipertensão pulmonar, uma importante causa de mortalidade na AF (Villagra et al. 2007; Ataga et al. 2008). Há também evidências de associações entre níveis de marcadores pró-coagulantes e desenvolvimento de retinopatia e AVCi (Ataga et al. 2012). O aumento nos marcadores biológicos de hipercoagulabilidade observado em pacientes em estado estável se agrava muito mais durante crises dolorosas, o que pode sugerir um possível papel da hipercoagulabilidade no desenvolvimento de eventos vaso-oclusivos (Solovey et al. 1998; Tomer et al. 2001; Shet et al. 2003; van Beers et al. 2009).

1.4. Mecanismos que levam à hipercoagulabilidade na anemia falciforme

O mecanismo central responsável pela ativação da coagulação na AF é motivo de debate, não existindo um consenso nesta questão. Existem três fatores que parecem contribuir de forma somatória para o desenvolvimento da hipercoagulabilidade, são eles: a disfunção endotelial, a inflamação e a hemólise intravascular.

A. Disfunção endotelial

A hemólise intravascular acarreta uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Durante a hemólise a hemoglobina é liberada do citoplasma das hemácias para o plasma, onde ela rapidamente reage com o NO levando ao seu consumo e redução. Também ocorre

liberação da arginase eritrocitária durante a hemólise, o que reduz a biodisponibilidade da arginina, um importante substrato para a síntese de NO pelas enzimas NO sintases. O NO é um regulador fundamental da homeostasia do endotélio e a sua deficiência acarreta um estado de disfunção endotelial. Além disso, o NO tem propriedades que inibem a ativação plaquetária, a expressão de FT e a geração de trombina e a sua deficiência tem uma importante contribuição para o estado pró-trombótico (Gladwin and Kato 2008; Morris 2008). O nível sérico da enzima lactato desidrogenase (LDH) é considerado um marcador clínico de hemólise intravascular e de biodisponibilidade do NO. A LDH serve como um marcador de disfunção endotelial associada à hemólise, que caracteriza um grupo de portadores de AF com um subfenótipo clínico de hipertensão pulmonar, úlceras de membros inferiores, priapismo, e óbito precoce (Kato et al. 2006).

Na AF temos um endotélio anormalmente ativado, pró-adesivo e pró-coagulante. Evidências indiretas de que o endotélio vascular na AF está com uma atividade exacerbada provêm inicialmente de estudos das células endoteliais circulantes (CECs) (Solovey et al. 1997). Nos portadores de AF estas células estão presentes na circulação em número aumentado e durante as crises vaso-oclusivas o número de CECs aumenta expressivamente. Uma característica importante destas CECs é que elas apresentam uma maior expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular (ICAM), a molécula de adesão de células vasculares (VCAM) e a E-selectina. Além disso, foi demonstrado que as CECs expressam na sua superfície o FT (Solovey et al. 1998). As CECs de indivíduos com AF expressam FT em porcentagem muito maior do que indivíduos normais (78%

x 10%), sendo esta expressão maior nos episódios de crise álgica (83%) do que no estado crônico (66%). Esta é uma alteração extremamente importante porque o FT é o grande iniciador fisiológico da coagulação, e ao ser exposto na circulação ele pode desencadear uma ativação das vias da coagulação. A análise de imunofluorescência destas CECs positivas para FT mostrou que elas também carregam o fator VII/VIII e são capazes de converter o fator X em Xa. Este dado é corroborado por um estudo anterior que mostrou que pacientes com AF apresentam níveis séricos menores do fator VII, indicando uma meia vida plasmática reduzida deste fator nestes pacientes, possivelmente devido à maior exposição ao FT (Kurantsin-Mills et al. 1992).

O fator de von Willebrand (FVW) é uma glicoproteína multimérica mediadora da adesão plaquetária que é secretada pelas células endoteliais. Em estados de ativação endotelial ocorre liberação de grandes quantidades de moléculas muito grandes e hiperadesivas do FVW. Na AF foi demonstrado que existe uma quantidade elevada do antígeno de von Willebrand no plasma, com presença de grandes quantidades de multímeros ultra-largos do FVW e uma atividade exacerbada do FVW (Chen et al. 2011). O aumento de grandes multímeros de FVW não reflete uma deficiência de ADAMTS13, mas pode ser resultado de secreção endotelial aumentada e/ou resistência do FVW à proteólise. As concentrações e a atividade do FVW tiveram uma correlação direta com o grau de atividade hemolítica, avaliada pelos níveis de LDH.

Diversos marcadores de ativação endotelial apresentam níveis plasmáticos aumentados nos pacientes com AF em comparação com

controles. Dentre estes marcadores solúveis estão o VCAM, ICAM, E-selectina e P-selectina (Kato et al. 2005).

B. Inflamação

A AF é reconhecidamente um estado pró-inflamatório crônico, com elevação de diversas citocinas pró-inflamatórias, aumento de contagens de leucócitos totais, monocitose e alterações funcionais do leucócitos (Platt 2000; Hebbel et al. 2004; Qari et al. 2012). Em outros estados pró-inflamatórios, como na sepse, existe uma ativação da coagulação e sabe-se que as vias inflamatórias e da coagulação estão intimamente relacionadas (Esmon 2004).

Pacientes com AF apresentam contagens elevadas de monócitos circulantes. Estes monócitos estão ativados, e por sua vez, são capazes de ativar as células endoteliais e contribuir para a inflamação vascular e para a ativação da coagulação (Belcher et al. 2000). Em experimentos in vitro, a encubação de leucócitos mononucleares de pacientes com AF com células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVECs) causou um aumento de expressão de moléculas de adesão endotelial como VCAM e ICAM e aumento na adesão de leucócitos polimorfonucleares (Belcher et al. 2000). A ativação das células endoteliais ocorreu por translocação do fator de transcrição NF-kappaB do citoplasma para o núcleo. O achado muito relevante deste estudo foi que os monócitos também induziram um aumento na expressão de FT pelas HUVECS na ordem de 1,9 vezes. Este achado foi confirmado por estudos em modelos murinos de AF. Em camundongos com AF os vasos da circulação pulmonar apresentam expressão aumentada do FT e esta expressão aumenta ainda mais após episódios de

hipóxia/reoxigenação (Solovey et al. 2004). A regulação desta expressão do FT pelas células endoteliais das vênulas pulmonares é feita por monócitos circulantes. O bloqueio da via NF-kappaB dos mononucleares causa uma redução importante na expressão do FT pelas células endoteliais (Kollander et al. 2010).

Além de ativarem a expressão do FT pelas células endoteliais, os monócitos na AF são capazes de expressarem por si mesmos o FT. A atividade pró-coagulante total do FT, mensurada através de ensaios de coagulação feitos com a fração de células mononucleares, também está aumentada na AF (Key et al. 1998). Nesses ensaios de coagulação toda a atividade pró-coagulante do FT se concentrou na fração de células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes com AF. Neste estudo as dosagens plasmáticas do FVIIa estavam diminuídas, indicando um consumo desencadeado pela ativação da coagulação, provavelmente mediado por esta atividade pró-coagulante do FT dos monócitos circulantes. Corroborando esta hipótese, os níveis plasmáticos de marcadores finais da ativação da coagulação como o D-dímero, apresentam uma correlação direta e linear com a contagem de monócitos em pacientes com DF (Westerman et al. 2002).

A interação entre as vias pró-inflamatória e pró-coagulante é bidirecional. Assim como estas alterações inflamatórias levam a expressão aumentada do FT e conseqüentemente ativação da coagulação, o contrário também é verdadeiro. Parece haver um papel do FT em desencadear ou alimentar o estado pró-inflamatório na AF (Sparkenbaugh and Pawlinski 2013). Estudos em camundongos falciformes demonstram que a inibição do

FT por um anticorpo anti-FT resultou na redução dos níveis plasmáticos dos marcadores pró-inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e amiloide sérico P. Além disso, houve redução da expressão de mieloperoxidase nos pulmões dos camundongos tratados com anti-FT, indicando redução da infiltração pulmonar por neutrófilos (Chantrathammachart et al. 2012).

C. Hemólise intravascular

O aumento na incidência de eventos trombóticos tem sido encontrado não apenas na AF, mas também em outras anemias hemolíticas, tais como a talassemia e a hemoglobinúria paroxística noturna (Cappellini 2007).

A exposição de fosfatidilserina na superfície dos eritrócitos na AF parece ter um papel importante na patogênese do estado de hipercoagulabilidade (Ataga et al. 2007). Normalmente, a fosfatidilserina é encontrada exclusivamente na camada interna da membrana celular das hemácias e só é exposta para sinalizar a remoção celular. A manutenção da assimetria dos fosfolípides da membrana eritrocitária é feita por enzimas ATP - dependentes, como a flipase e a scramblase. Acredita-se que as anormalidades encontradas nos fosfolípides das membranas eritrocitárias na AF devam-se a danos oxidativos e aos ciclos repetidos de falcização e desfalcização. Está demonstrado que pacientes com DF, tanto SS quanto SC, apresentam níveis elevados de hemácias positivas para fosfatidilserina, em comparação com indivíduos normais (Setty et al. 2001). As consequências da exposição da fosfatidilserina incluem a exarcebação da anemia, devido ao reconhecimento e remoção das hemácias pelo sistema fagocítico, e aumento da adesividade ao endotélio. Além disso, a

fosfatidilserina serve como sítio ancoradouro para complexos enzimáticos envolvidos na ativação da coagulação, sendo cofator do fator Xa na conversão da protrombina em trombina. Estudos anteriores demonstraram este efeito *in vitro*, ao encubarem preparações de glóbulos vermelhos com protrombina e fator Xa para análise das curvas de geração de trombina (Helley et al. 1997). Os eritrócitos SS e, em menor escala, as hemácias SC e AS, aceleraram a ativação da protrombina pelo fator Xa. Os níveis de glóbulos vermelhos positivos para fosfatidilserina apresentaram correlação positiva com níveis séricos elevados de marcadores de geração de trombina e de fibrinólise, tais como o F1+2, TAT, D-dímero, e complexos plasmina-antiplasmina (Setty et al. 2000; Setty et al. 2001).

Os ciclos de falcização e desfalcização das hemácias também levam à formação e liberação de micropartículas positivas para fosfatidilserina. Micropartículas são vesículas constituídas apenas por citoesqueleto circundado pela membrana celular, que em geral é rica em fosfatidilserina. A quantidade total de micropartículas circulantes na AF é muito elevada no estado crônico e aumenta ainda mais nas crises álgicas (Shet et al. 2003). As micropartículas são de diversas linhagens celulares, incluindo eritrócitos, plaquetas, monócitos e células endoteliais, mas apenas as micropartículas derivadas de monócitos e células endoteliais expressam o FT na sua superfície (Shet et al. 2003). Estas micropartículas foram capazes de encurtar o tempo de protrombina de amostras de plasma normal e a atividade pró-coagulante foi bloqueada ao se acrescentar um anticorpo bloqueador do FT. Em um segundo estudo, as micropartículas positivas para fosfatidilserina

isoladas de pacientes com AF foram capazes de promover geração de trombina *in vitro* (Westerman et al. 2008).

Além da exposição de fosfatidilserina e formação de micropartículas, outra consequência da hemólise intravascular é a liberação da hemoglobina intracelular e seus fragmentos, dentre eles o radical heme. Experimentos *in vitro* demonstraram que o heme é capaz de estimular células endoteliais (culturas de HUVECs e células endoteliais pulmonares) a sintetizarem e expressarem o FT na sua superfície (Setty et al. 2008). Este estímulo é concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração de heme maior a expressão de FT pelas células endoteliais. O heme também causa ativação plaquetária em experimentos *in vitro* usando plasma rico em plaquetas de pacientes com AF (Villagra et al. 2007). Novamente, o grau de estimulação plaquetária foi proporcional à concentração de heme. O heme também foi capaz de bloquear o efeito inibitório do NO na ativação plaquetária.

1.5. Estratégias terapêuticas para reequilíbrio do balanço hemostático na anemia falciforme

A. Anticoagulantes e antiagregantes plaquetários

Diante das evidências de um estado de hipercoagulabilidade na AF, alguns estudos clínicos foram realizados na tentativa de modular esta hipercoagulabilidade através do uso de agentes como anticoagulantes e antiagregantes plaquetários. Seria esperado que o uso da aspirina teria importantes benefícios neste sentido, tendo em vista que se trata de uma droga com ação antiagregante e também anti-inflamatória. Existem alguns

estudos pequenos com uso de aspirina, onde os efeitos antiagregantes não demonstraram correlação com efeitos clínicos benéficos (Ataga and Key 2007). Um estudo randomizado, duplo-cego, com uso de ticlopidina mostrou redução na frequência e severidade das crises vaso-oclusivas (Cabannes et al. 1984). Mais recentemente, um estudo de fase 2, duplo-cego, randomizado, comparou o uso do antiagregante prasugrel versus placebo em pacientes com AF (Wun et al. 2013). Houve redução de biomarcadores de ativação plaquetária e uma diminuição não significativa de eventos dolorosos no grupo em uso de prasugrel. A avaliação dos anticoagulantes orais foi feita em poucos estudos que incluíram um reduzido número de pacientes e/ou não randomizados (Ataga and Key 2007). Já o uso da heparina não-fracionada em mini-doses demonstrou redução na frequência e severidade das crises vaso-oclusivas (Chaplin et al. 1989). Em resumo, estes estudos não foram convincentes em demonstrar benefícios no uso destas medicações para prevenção ou tratamento das complicações vaso-oclusivas ou de complicações tromboembólicas na AF.

B. Indução da hemoglobina fetal

Há muitos anos se sabe que a hemoglobina fetal (HbF) tem um efeito benéfico nos pacientes com AF, atenuando as manifestações clínicas. Sabe-se que a presença da HbF altera o contato entre as moléculas de HbS, prejudicando a formação do polímero, com consequente redução do processo de falcização. O nível de HbF nestes doentes é considerado um importante fator prognóstico para várias complicações clínicas, incluindo as

crises álgicas, a síndrome torácica aguda e o óbito (Fathallah and Atweh 2006).

Portadores de AF com altos níveis de HbF sofrem menos ciclos de falcização e desfalcização, conseqüentemente há menor exposição da fosfatidilserina e redução da formação das micropartículas. Isto foi comprovado em um estudo com crianças portadoras de AF, onde se demonstrou que os altos níveis de células F (eritrócitos ricos em HbF) correlacionaram-se inversamente com o número de microvesículas derivadas de eritrócitos e com a positividade dos eritrócitos para fosfatidilserina (Setty et al. 2000). Também houve uma modulação da geração de trombina *in vivo*: os altos níveis de células F estiveram associados a menores dosagens do F1+2. Nesse estudo, os pacientes com um nível de células F de aproximadamente 70% apresentaram níveis normais de F 1+2 e formação de microvesículas semelhante aos controles normais. Recentemente um segundo estudo em crianças portadoras de AF também demonstrou que existe uma correlação negativa entre o nível de HbF e a quantidade total de micropartículas, micropartículas derivadas de eritrócitos, plaquetas e monócitos (Nebor et al. 2013).

Em função dos conhecidos efeitos benéficos da HbF, há alguns anos estão sendo pesquisadas terapêuticas capazes de estimular a sua síntese. Diversos agentes indutores da HbF estão em estudo, tais como a 5-azacitidina, a decitabina e o butirato de arginina (Fathallah and Atweh 2006). Porém, na prática clínica, a única droga aprovada para uso na AF é a hidroxiuréia. Os demais agentes ainda são considerados experimentais.

C. Hidroxiuréia

A hidroxiuréia é uma droga citotóxica, sintetizada em 1869. Na década de 1960 ela passou a ser usada como droga citoreductora em pacientes com síndromes mieloproliferativas (Rees 2011). Em 1984 a hidroxiuréia foi testada em macacos, e em seguida em pacientes, e foi demonstrado o seu efeito em aumentar os níveis de HbF (Platt et al. 1984). A hidroxiuréia tem um radical que tem uma ação inibitória na enzima ribonucleotídeo redutase durante a fase S do ciclo de divisão celular. Assim, a hidroxiuréia muda a cinética da proliferação eritroide favorecendo a formação das células F a partir de precursores eritroides primitivos e de divisão mais lenta. Este efeito deve-se à inibição da produção de glóbulos vermelhos ricos em HbS formados a partir dos precursores eritroides maduros de rápida proliferação e ao aumento da expressão do gene da globina γ . A hidroxiuréia tem um outro radical que ao ser metabolizado gera a produção de NO, o qual estimula diretamente a produção de cadeias globina γ , e consequentemente HbF, através da via da guanilil ciclase solúvel (Ikuta et al. 2001; Cokic et al. 2003; Platt 2008).

Na prática clínica, a hidroxiuréia é capaz de reduzir o número de crises álgicas de em média 4,5 episódios por ano para 2,5 episódios por ano (Charache et al. 1995). Seu uso também reduz a ocorrência de episódios de síndrome torácica, diminui a necessidade de transfusões e reduz a mortalidade destes doentes (Platt 2008). Estudos com seguimento a longo prazo mostram uma redução de 40% da mortalidade (Steinberg et al. 2003). A hidroxiuréia está formalmente indicada para pacientes que apresentem três ou mais episódios dolorosos em um ano, síndrome torácica aguda, episódios vaso-oclusivos graves ou anemia severa sintomática (Brawley et al. 2008).

Indução da HbF é o seu principal mecanismo de ação, porém a hidroxiuréia é uma droga com diversos efeitos pleiotrópicos, nem todos claramente definidos.

D. Terapia gênica

Considerando-se que a AF é uma doença monogênica, com uma mutação bem definida, ela representa um alvo muito atrativo para a terapia gênica. Inúmeras tentativas de transferência gênica para as células tronco hematopoiéticas estão em andamento em estudos pré-clínicos (Persons 2009). Uma forma já estabelecida de tratamento onde há uma correção do defeito genético é o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O primeiro TCTH alogênico para AF foi reportado em 1984 (Johnson et al. 1984) e desde então mais de 250 pacientes com AF foram transplantados mundialmente (Bhatia and Walters 2008). Os resultados clínicos são excelentes, com taxas de sobrevida livre de doença em torno de 80-85% (Vermylen 2003). Muito provavelmente ocorre normalização das alterações pró-coagulantes em pacientes com AF submetidos ao TCTH alogênico, porém isso nunca foi reportado na literatura.

1.6. Hipercoagulabilidade na Hemoglobinopatia SC

A hemoglobinopatia SC (HbSC) é a segunda hemoglobinopatia mais prevalente após a AF (homozigotos - HbSS) (Weatherall 2010). A hemoglobina C (HbC) também resulta de uma mutação de ponto no mesmo local da cadeia β^s , porém aqui o ácido glutâmico é substituído por uma lisina (Hannemann et al. 2011). A HbC tem a característica de induzir a

desidratação eritrocitária e formar cristais intracelulares. Hemácias com HbC apresentam uma alta atividade do cotransportador de membrana K-Cl que induz um alto efluxo de K^+ da célula, com consequente desidratação celular (Nagel et al. 2003; Hannemann et al. 2011). O resultado são hemácias mais densas, microcíticas, hipercrômicas e com elevada concentração de hemoglobina corpuscular média. O estado homozigótico do gene HbC resulta apenas em uma anemia hemolítica leve. Na HbSC coexistem concentrações semelhantes de HbC e HbS. Ao desidratar a hemácia, a HbC potencializa as propriedades patogênicas da HbS com a formação dos polímeros de HbS, resultando em uma doença clinicamente relevante (Nagel et al. 2003). Todas as complicações clínicas encontradas na AF são vistas na HbSC, porém com menor frequência e intensidade. Estudos voltados para a avaliação de complicações clínicas na hemoglobinopatia SC mostram que as complicações crônicas mais prevalentes são a retinopatia, presente em 23-70% dos casos, distúrbios otológicos, presente em 29% dos casos, e osteonecrose, presente em 12-23% dos casos (Koduri et al. 2001; Powars et al. 2002; Lionnet et al. 2012).

Estudos têm demonstrado um risco aumentado de eventos tromboembólicos na HbSC, sendo estes pacientes incluídos na casuística de estudos de DF (Stein et al. 2006; Novelli et al. 2012). Estudos de autópsias mostram que a embolia pulmonar é a segunda maior causa de mortalidade nestes pacientes, responsável por 13,6% dos óbitos, sendo uma causa de óbito mais freqüente que na AF (Manci et al. 2003). A incidência de AVCi na infância também é aumentada, sendo da ordem de 100 vezes maior que na população geral (Powars et al. 1990). No entanto, pouco se sabe sobre a

ativação da coagulação nesta doença. Apesar da elevada prevalência da HbSC, ela é comparativamente negligenciada, sendo que a maior parte das informações que temos são inferidas de estudos onde a AF é o foco principal, o que pode não ser correto dado às características fisiopatológicas distintas da HbSC.

Diante das evidências de um estado de hipercoagulabilidade presente em pacientes com AF, e da ausência de estudos que investiguem a hipercoagulabilidade específica da HbSC, o presente trabalho foi dividido em duas partes, tendo dois objetivos principais: (1) testar a hipótese de que a hidroxiuréia teria um efeito benéfico no estado de hipercoagulabilidade visto na AF e (2) avaliar o estado de hipercoagulabilidade presente na HbSC.

2. OBJETIVOS

2.1 Parte 1 – Efeito da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme:

- A.** Estudar o efeito da hidroxiuréia nos diversos componentes do balanço hemostático, em portadores de AF com e sem uso de hidroxiuréia, através do estudo:
 - a.) Expressão do fator tecidual
 - b.) Marcadores finais da geração de trombina
 - c.) Marcadores de inflamação e ativação endotelial
- B.** Em um modelo murino de AF incapaz de expressar a HbF avaliar o efeito da hidroxiuréia em marcadores da coagulação, inflamação e ativação endotelial.

2.2 Parte 2 – Estado de hipercoagulabilidade na hemoglobinopatia SC:

- A.** Avaliar o estado de hipercoagulabilidade em portadores de HbSC, comparando-os à controles normais e portadores de AF.
- B.** Avaliar as correlações entre as alterações da coagulação e a presença de complicações clínicas na HbSC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados dentro da coorte de pacientes em seguimento no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hemocentro Unicamp no período de agosto de 2009 a dezembro de 2012. Foram incluídos apenas indivíduos com diagnóstico de AF (genótipo SS) ou HbSC, em condição estável (*steady state*) sem história de internação hospitalar, crise vaso-oclusiva ou transfusão sanguínea nos três meses precedentes à inclusão. Não foram incluídos pacientes que estivessem grávidas ou em uso de anticoagulação oral. O uso de outras medicações, incluindo aspirina, não foi critério de exclusão do estudo.

No estudo dos pacientes com AF, os pacientes foram divididos em dois grupos: (1) em uso de hidroxiuréia (SS-HU), incluindo pacientes em uso de hidroxiuréia há mais de três meses na dose mínima de 10mg/kg, e (2) sem uso de hidroxiuréia (SS). No grupo de pacientes com HbSC, nenhum paciente estava em uso de hidroxiuréia.

Foram selecionados 25 indivíduos da mesma faixa etária para o grupo de controle sadios, composto por doadores de plaquetas por aférese do Hemocentro da Unicamp. Todos os doadores selecionados tinham padrão de eletroforese de hemoglobinas AA.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (CEP/FCM/UNICAMP), parecer nº 792/2009 (Anexo 1), e o termo de consentimento foi obtido dos pacientes e indivíduos controles (Apêndice 1).

3.2. Coleta de dados clínicos

Os dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo foram obtidos a partir da revisão dos prontuários médicos, realizada no momento da inclusão no estudo. Para os pacientes com HbSC e os do grupo SS foram coletadas as informações clínicas do momento da inclusão no estudo. Para os pacientes do grupo SS-HU foram obtidos os dados referentes a indicação da hidroxiuréia e as informações clínicas de dois momentos diferentes: (1) antes do início da terapia com hidroxiuréia e (2) durante o tratamento com hidroxiuréia, no momento da inclusão no estudo.

Os dados clínicos obtidos foram: nome, sexo, data de nascimento, peso, diagnóstico, dados do tratamento com hidroxiuréia (indicação clínica, data de início, dose utilizada), ocorrência de crises álgicas, presença de complicações relacionadas à doença falciforme (retinopatia, priapismo, acidente vascular cerebral, úlceras de membros inferiores, hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda, osteonecrose de fêmur ou úmero, tromboembolismo venoso) e medicações utilizadas.

3.3. Coleta de dados laboratoriais e preparação das amostras de sangue

As amostras de sangue para todas as análises laboratoriais, incluindo hemograma, HbF e provas de hemólise, foram obtidas simultaneamente, por punção venosa no momento da coleta de exames de rotina do seguimento ambulatorial.

A coleta foi realizada com a aplicação de um torniquete leve e o primeiro tubo coletado não era utilizado para os testes de coagulação para evitar artefatos associados à punção venosa. As amostras eram

processadas dentro de 2 horas da coleta, sendo submetidas à separação do plasma pobre em plaquetas, através de centrifugações a 2500g por 15 minutos, divididas em alíquotas, congeladas a -80°C até as análises, e descongeladas a 37°C por 5 minutos no momento dos testes.

3.4. Quantificação da expressão do fator tecidual

A. Expressão gênica – PCR quantitativo em tempo real

Com base no seqüenciamento do gene do FT escolhemos uma sequência de nucleotídeos encontrados nos exons 4 e 5 para desenhar o nosso par de iniciadores para amplificação do gene do *FT*. Com auxílio dos programas Gene Runner e Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verificamos a especificidade, temperatura de dissociação e formação de estruturas secundárias do par de iniciadores. As sequências dos iniciadores escolhidos e suas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Par de iniciadores do gene do *fator tecidual*

Iniciador	Características
Forward	5' TCA GGA AAG AAA ACA GCC AAA AC 3' Total de nmole: 10,3 nmole Densidade óptica: 3,0 Temperatura de dissociação: 56,3° C Conteúdo GC: 39,1% Peso molecular: 7076,5g/mole
Reverse	5' GGG AGG GAA TCA CTG CTT GA 3'

	Total de nmole: 8,8 nmole Densidade óptica: 2,0 Temperatura de dissociação: 56,1° C Conteúdo GC: 55% Peso molecular: 6221,9g/mole
--	--

Para verificar a concentração ideal dos iniciadores do gene do *FT* realizamos uma curva com as concentrações de 150nM, 300nM, 400nM, 600nM e 800nM. O objetivo era escolher a menor concentração dos iniciadores que obtivesse o menor ciclo *threshold* (Ct) com o maior delta de reporter normalizado (ΔRn). Utilizamos cDNA de duas linhagens leucêmicas, a U937 (monocítica) e a K562 (eritroleucêmica). Escolhemos a concentração de 600nM, pois apresentou os melhores resultados, tanto nas amostras com baixa expressão (linhagem K562) quanto nas de alta expressão do gene (linhagem U937). As reações em cadeia da polimerase quantitativo (PCRq) em tempo real foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As curvas de amplificação e de dissociação do gene do *FT* estão ilustradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

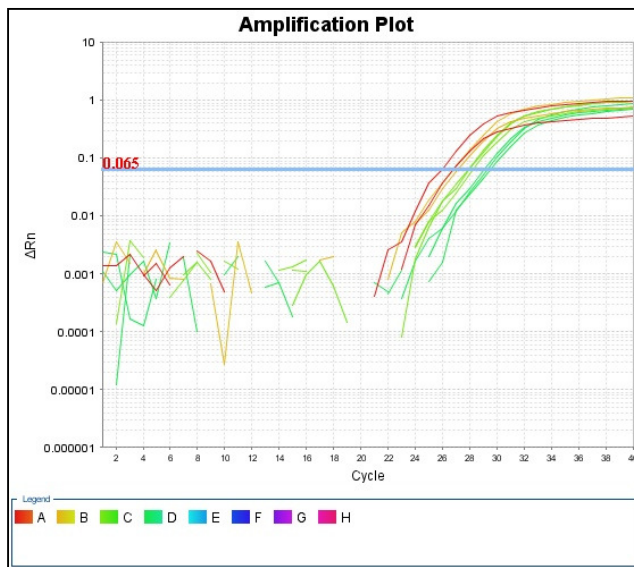


Figura 2 - Curva de amplificação do gene do *fator tecidual* nas concentrações crescentes do par de iniciadores. O eixo y representa o ΔRn (intensidade da fluorescência) e o eixo x representa o número de ciclos.

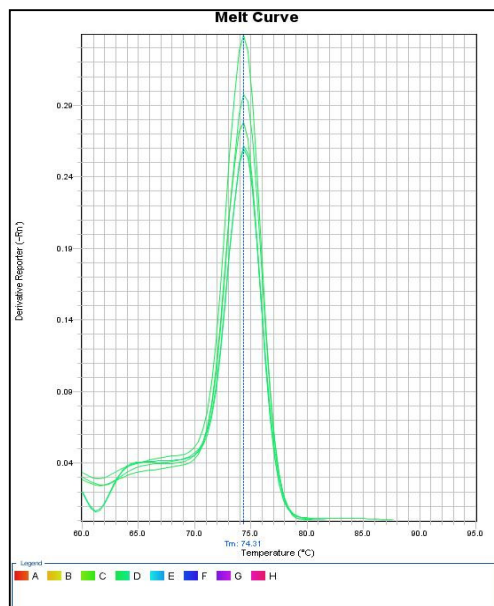


Figura 3 - Curva de dissociação dos iniciadores, demonstrando sua especificidade. O pico único demonstra sua especificidade. O eixo x representa a temperatura de dissociação em graus Celsius.

Para avaliarmos a eficiência dos iniciadores do *FT* realizamos uma curva com quatro diluições seriadas na ordem de 1:2 na concentração do cDNA. Cada diluição do experimento foi realizada em triplicata. Utilizamos cDNA da linhagem leucêmica U937 por ter uma alta expressão do gene do *FT*, e a concentração inicial de cDNA utilizada foi de 240ng. Conforme a ilustração abaixo (Figura 4), pode-se verificar que os iniciadores tiveram eficiência próxima de 100%.

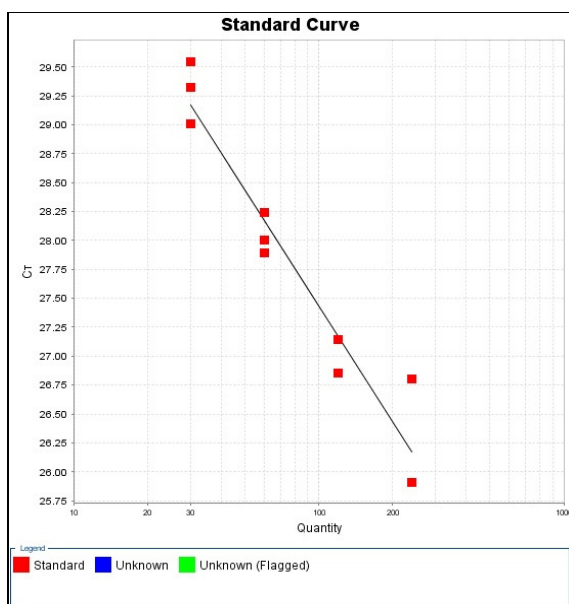


Figura 4 – Curva de eficiência do par de iniciadores do gene do *fator tecidual*. São quatro pontos de diluição do DNA, demonstrando uma eficiência próxima a 100%. O eixo y indica o Ct e o eixo x indica a concentração do cDNA.

Dois candidatos a controles endógenos para normalização da expressão gênica foram selecionados: *HPRT* e *β -Actina*. Realizamos um teste de compatibilidade entre estes controles endógenos e o *FT*, usando a curva de

diluição seriada de cDNA na ordem de 1:2 com 4 pontos. Novamente usamos cDNA da linhagem U937, partindo de uma concentração inicial de cDNA de 240ng. Realizamos o PCRq nas diferentes concentrações de cDNA com o gene alvo (*FT*) e os controles endógenos, com cada reação sendo realizada em triplicata. Após obtermos curvas de eficiência de 100%, com tolerância de 10% na eficiência para mais ou para menos, realizamos a extração e média dos Cts. Construímos um gráfico para representar a cinética e compatibilidade entre o gene alvo e os controles endógenos (Figura 5). Calculamos o ΔCt (Ct gene alvo- Ct do controle endógeno) em cada concentração e plotamos no eixo y do gráfico. No eixo x colocamos os valores do log da diluição dos diversos pontos de cDNA. A equação da reta, com fórmula $y=ax+b$, indica o valor de referencia da compatibilidade, onde “a” deve ficar no intervalo de -0,1 a 0,1 para ser considerado compatível. Os dois genes endógenos foram considerados compatíveis. As sequências dos iniciadores do *HPRT* e *β -Actina* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores dos controles endógenos

Gene	Sequência
<i>β-Actina</i>	FW: 5'AGG CCA ACC GCG AGA AG 3' RW: 5'ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'
<i>HPRT</i>	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3' RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

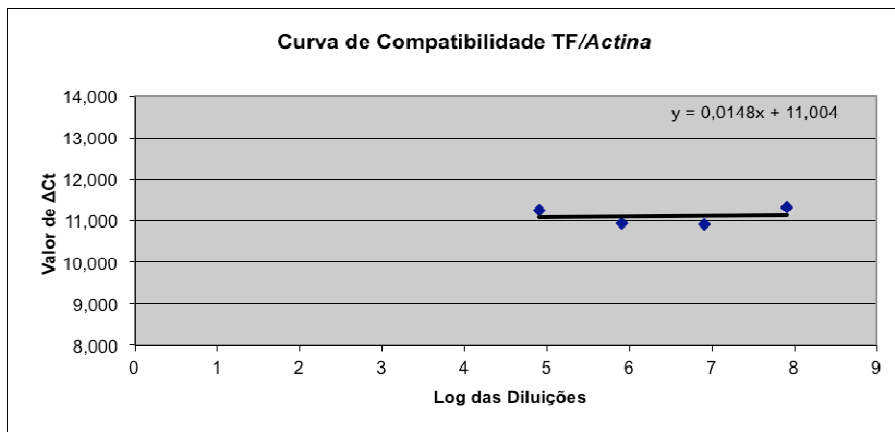


Figura 5 - Teste de compatibilidade entre o gene do *fator tecidual* e o controle endógeno *β-Actina*. A equação da reta $y=ax+b$ indica o valor de referência da compatibilidade, onde “a” deve ficar no intervalo de -0,1 a 0,1 para ser considerado compatível. O valor de “a” foi de 0,0148 para o *β-Actina* indicando ótima compatibilidade. O eixo y indica o valor do ΔCt e o eixo x o log das diluições do cDNA.

Para avaliarmos a expressão gênica do *FT* extraímos RNA de amostras de sangue periférico, colhidas em EDTA, de pacientes e controles normais. O material foi submetido à lise das hemácias com tampão contendo cloreto de amônia e o RNA isolado utilizando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras de RNA, contendo 1 μg de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA com uso da enzima transcriptase reversa (Fermentas, Carlsbad, CA, USA). Verificamos a qualidade da transcrição do cDNA através de PCR simples para o gene da *β-Actina*.

Realizamos o PCRq para determinar a expressão do gene do *FT* nos pacientes selecionados e em controles normais. Cada amostra foi avaliada

com o gene alvo e os dois controles endógenos. Todas as reações foram realizadas em triplicata, usando a concentração de cDNA de 120ng/ul. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. O controle endógeno que apresentou a melhor cinética de reação com o *TF* foi o *β-Actina* e ele foi escolhido para normalização da expressão relativa. A amostra de um controle normal foi utilizada como amostra calibradora.

B. Expressão proteica

Realizamos uma quantificação do antígeno do FT no plasma através de kits comercialmente disponíveis de ensaio imunoenzimático (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) (IMUBIND®, American Diagnostica Inc., Stamford, CT, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.5. Quantificação dos marcadores de geração de trombina

Os marcadores de geração de trombina estudados foram o F1+2, o TAT, e o D-dímero quantificados por kits comercialmente disponíveis de ELISA (TAT e F1+2- Enzygnost®, Siemens, Marburg, Alemanha; D-dímero – Sekisui Imuclone® D-Dimer, Stamford, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Todas as análises foram realizadas em duplicata, em amostras de plasma.

3.6. Quantificação do marcador de ativação endotelial

Os níveis plasmáticos do antígeno solúvel da trombomodulina foram quantificados como marcador da ativação endotelial. Suas quantificações foram feitas em duplicata, por kits comercialmente disponíveis de ELISA (IMUBIND®, American Diagnostica Inc., Stamford, CT, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7. Quantificação dos marcadores de inflamação

Os marcadores inflamatórios estudados foram o TNF- α e a IL-8. Os níveis séricos do TNF- α e IL-8 foram mensurados em duplicata, por kits comercialmente disponíveis de ELISA (TNF- α US e IL-8 US, Invitrogen, Camarillo, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os kits utilizados são ultra-sensíveis, com os seguintes limites de detecção: TNF- α - 0,09 pg/mL e IL-8 – 0,1 pg/mL.

3.8. Experimentos no modelo murino de anemia falciforme

O modelo murino experimental de AF foi obtido através do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Nesse procedimento, camundongos selvagens C57BL/6, todos provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB-Unicamp, Campinas, SP, Brasil), foram irradiados até a depleção total da medula óssea com 2 doses de 1200 rad com intervalos de 3 horas. Em seguida os animais receberam as células hematopoiéticas de medula óssea provenientes de camundongos Berkeley. Este modelo de camundongos Berkeley expressa apenas cadeias de globinas β^S humanas, não sendo capaz de produzir HbF (Paszty et al. 1997). Após 11 semanas do transplante verificamos se houve pega medular

eficiente através de eletroforese de hemoglobinas séricas em gel de acrilamida feita com amostra de sangue coletada da ponta da cauda dos animais. Apenas os animais com hemoglobina humana >97% foram utilizados no estudo.

Dividimos os animais transplantados em dois grupos experimentais: um grupo controle que recebeu apenas solução fisiológica e um grupo que recebeu hidroxiuréia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a comprovação da pega medular foi iniciado o tratamento com hidroxiuréia, na dose de 50 mg/kg, por injeção intraperitoneal 5 vezes por semana. Esta dose de hidroxiuréia foi escolhida por ter sido a dose máxima tolerada neste modelo experimental em um estudo prévio (Lebensburger et al. 2010). O grupo controle recebeu injeções intraperitoneais de solução fisiológica. O tratamento com a hidroxiuréia ou solução fisiológica teve a duração de 16 semanas. Após este período foi realizada a coleta final das amostras. Previamente aos procedimentos invasivos, os animais foram anestesiados com solução salina estéril contendo quetamina 80-100 mg/kg e xilazina 5-10 mg/kg por via intra-dérmica. Após a anestesia geral foi feita uma laparotomia com incisão mediana e punção direta da veia cava para coleta das amostras de sangue total em tubos contendo anticoagulante citrato a 3,2%. A punção da veia cava foi selecionada como método de coleta por ser a via em que a ativação da coagulação é menos pronunciada, se comparada com punção cardíaca ou retro-orbital. Ao final da coleta os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As amostras coletadas foram submetidas ao processamento, respeitando o tempo máximo de 30 minutos entre a coleta e o início da centrifugação. O plasma foi obtido por centrifugação a 4000g por

15 minutos, divididos imediatamente em alíquotas e armazenado a -80°C.

Posteriormente, realizamos a quantificação dos marcadores TAT, IL-6 e sVCAM-1 nas amostras de plasma dos animais. Todos os marcadores foram mensurados em duplicata, por kits comercialmente disponíveis de ELISA (TAT - Enzygnost®, Siemens, Marburg, Alemanha; IL-6 e sVCAM-1 - R&D Systems Quantikine, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), protocolo nº 2787-1 (Anexo 2).

3.9. Análises estatísticas

Os pacientes incluídos no estudo da AF foram divididos em dois grupos: um sem uso de hidroxiuréia (SS) e outro em uso de hidroxiuréia (SS-HU). As comparações entre os dois grupos de pacientes e grupo controle foram realizadas usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis contínuas. O teste de Fisher foi utilizado para as análises de variáveis categóricas. As correlações entre os diversos parâmetros laboratoriais foram realizadas com o teste de correlação de Spearman. Para avaliarmos o impacto da terapia com hidroxiuréia, HbF, hemólise, inflamação e ativação endotelial nos marcadores de hipercoagulabilidade, nós realizamos uma análise de regressão linear multivariada com critério *Stepwise* de seleção de variáveis. As variáveis contínuas sem distribuição Normal foram transformadas em postos (*ranks*).

Nos experimentos com modelo murino de AF os animais foram divididos em dois grupos experimentais e as comparações entre os dois grupos foi feito pelo teste de Mann-Whitney.

No estudo da HbSC, os pacientes com HbSC foram comparados com os pacientes SS e SS-HU e com controles sadios através do teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste de Fisher para variáveis categóricas. As correlações entre os diferentes parâmetros laboratoriais foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman. Para avaliarmos as associações entre as complicações clínicas e marcadores da coagulação realizamos o teste de Mann-Whitney.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Parte 1 – Estudo do efeito da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme:

A. Características dos pacientes incluídos

Um total de 38 pacientes portadores de AF (homozigotos SS) foi incluído na parte 1 do estudo, todos em condição estável (sem crises, hospitalizações ou transfusões nos 3 meses precedentes). Dentre os pacientes incluídos, 23 faziam uso de hidroxiuréia (denominados SS-HU) e 15 não faziam uso da droga (denominados SS). No grupo de pacientes em uso da hidroxiuréia as doses variaram de 11-34mg/kg/d (média de 20mg/kg/d) e o tempo de tratamento de 3-196 meses (mediana de 28 meses). A dose era ajustada de acordo com a melhora clínica ou até a dose máxima tolerada. Pacientes com insuficiência renal ou que apresentaram elevação da hemoglobina para valores acima de 11g/dL tiveram as doses de tratamento com hidroxiuréia reduzidas. As indicações clínicas para o tratamento com hidroxiuréia foram: crises álgicas de repetição em 44% (n=10); síndrome torácica aguda em 17% (n=4); acidente vascular cerebral em 17% (n=4) e anemia hemolítica grave em 22% (n=5). Pacientes em terapia com hidroxiuréia, quando comparados ao grupo sem hidroxiuréia, tinham um antecedente de fenótipo clínico mais grave antes do início do tratamento, indicado pela maior frequência de complicações clínicas. Os níveis de HbF, LDH, bilirrubina indireta e contagens de leucócitos dos pacientes SS-HU mensurados antes do início do tratamento com hidroxiuréia foram semelhantes aos valores dos pacientes sem indicação do uso da droga (SS). O tratamento com hidroxiuréia resultou em melhora significativa nestes

parâmetros laboratoriais no grupo de pacientes tratados. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

	SS n=15	SS-HU n=23		p^2 SS vs. SS-HU pré	p^2 SS vs. SS-HU pós	p^2 SS-HU pré vs. SS-HU pós
		SS-HU pré ¹	SS-HU pós			
<i>Características clínicas:</i>						
Idade (anos) ³	28 (24,43)	33 (25,42)	38 (31,43)	0.97	0.20	0.06
Sexo: Masculino/Feminino ⁴	4(27)/ 11(73)	6(26)/ 17(74)	NA	1.0	NA	NA
Traço α-talassêmico ^{4,5}	3 (27)	6 (30)	NA	1.0	NA	NA
<i>Complicações clínicas:</i> ⁴						
- Crises álgicas de repetição ⁶	0	13 (57)	0	0.008	1.0	<0.0001
- Síndrome torácica aguda	1 (7)	6 (26)	1 (4)	0.20	1.0	0.09
- Acidente vascular cerebral ⁷	0	7 (30)	7 (30) ⁸	0.03	0.03	1.0
- Úlceras venosas	2 (13)	3 (13)	2 (8)	1.0	1.0	1.0
- Retinopatia	3 (20)	10 (44)	10 (44) ⁸	0.18	0.18	1.0
- Osteonecrose	1 (7)	6 (26)	6 (26) ⁸	0.21	0.21	1.0
<i>Características laboratoriais:</i> ³						
Hemoglobina fetal (%)	4.9 (4, 6.4)	6.7 (2.8, 8.7)	16.8 (13, 22)	0.07	<0.0001	<0.0001
Lactato desidrogenase (U/L)	1092 (897,1616)	875 (803,1253)	710 (611,770)	0.24	<0.0001	0.02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	3.5 (1.5, 5)	3.0 (2.3, 3.7)	1.5 (1, 2.3)	0.49	0.006	0.005
Hemoglobina (g/dL)	7.2 (6.6, 8)	8.3 (7.5, 8.7)	9.1 (8.4, 10.3)	0.06	<0.0001	0.002
Hematócrito (%)	20.2 (18.3, 24.3)	24.5 (23.1, 25.9)	27.1 (25.1, 30.1)	0.02	<0.0001	0.009
Volume corpuscular médio (fL)	86.6 (85.7, 92.5)	91.6 (85, 100)	111 (103.6, 121)	0.19	<0.0001	<0.0001
Contagem de reticulócitos (x10 ⁹ /L)	306 (256, 373)	372 (253, 423)	179 (134, 265)	0.19	0.003	<0.0001
Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L)	12.2 (8.6, 13.1)	11 (8, 12.5)	7.5 (6.3, 8.6)	0.57	<0.0001	0.0001
Contagem de neutrófilos (x10 ⁹ /L)	5.1 (4.6, 6.8)	5.2 (3.5, 6.7)	3.1 (2.7, 4.1)	0.88	0.0009	0.0005
Contagem de monócitos (x10 ⁹ /L)	1.1 (0.9, 1.3)	1.0 (0.7, 1.2)	0.6 (0.4, 0.9)	0.08	0.0007	0.006
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /L)	430 (312, 586)	478 (406, 564)	419 (275, 480)	0.21	0.57	0.04

Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU - pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia (SS-HU pré: dados clínicos e laboratoriais de antes do início do tratamento com

hidroxiuréia; SS-HU pós: dados clínicos e laboratoriais durante o tratamento com hidroxiuréia, coletados no momento da inclusão no estudo); NA: não se aplica.

¹Nós coletamos informações referentes às características clínicas e laboratoriais dos pacientes antes do início do tratamento com hidroxiuréia. Os dados clínicos dos 23 pacientes são conhecidos. Valores de hemoglobina fetal, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, contagem de reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas estavam disponíveis para 19 pacientes; lactato desidrogenase para 5 pacientes e bilirrubina indireta para 20 pacientes.

²As idades dos pacientes e os dados laboratoriais foram comparados com o teste U de Mann-Whitney. As demais características clínicas foram comparadas usando o teste de Fisher.

³Dados representados como: mediana (percentis 25, 75).

⁴Dados representados como: número (%).

⁵Traço α -talassêmico: deleção -3.7kb ($-\alpha$ 3.7). Os resultados estavam disponíveis para 11 pacientes no grupo SS e 20 pacientes no grupo SS-HU.

⁶Crises álgicas de repetição foram definidas como presença de três ou mais crises por ano.

⁷Pacientes com acidente vascular cerebral eram submetidos a transfusão regular por um período de 2 a 5 anos e depois colocados em tratamento com hidroxiuréia. Para estes pacientes, as características laboratoriais prévias ao tratamento com hidroxiuréia foram coletadas antes do início da transfusão regular.

⁸Nenhum evento novo ocorreu após o início do tratamento com hidroxiuréia.

B. Expressão relativa do fator tecidual

O PCRq evidenciou um aumento na expressão relativa do *FT* em ambos os grupos de pacientes em comparação com os controles normais (5.0[SS] vs. 1.2[controles], $p=0.0004$; 2.6[SS-HU] vs. 1.2[controles], $p=0.001$). Ao compararmos os dois grupos de pacientes, verificamos que os pacientes sem uso de hidroxiuréia apresentam valores do *FT* significativamente maiores do que os pacientes em uso da droga (5.0[SS] vs. 2.6[SS-HU], $p=0.02$) (Figura 6 e Tabela 4).

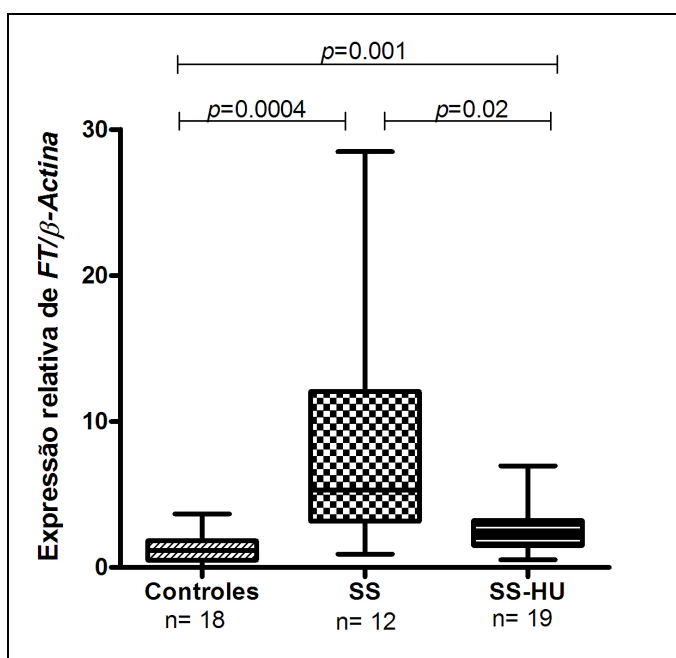


Figura 6 - Expressão relativa do fator tecidual nos pacientes com anemia falciforme e controles. A expressão relativa do gene do *fator tecidual* (*FT*) foi estudada por PCRq em cDNA de leucócitos totais em pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores relativos da expressão do *FT/β-Actina*. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U

de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia;

SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

C. Níveis plasmáticos do fator tecidual

A redução na expressão relativa do *FT* em pacientes em uso de hidroxiuréia foi confirmada pelas medidas dos níveis plasmáticos da proteína do FT. Uma grande proporção dos pacientes e controles tiveram níveis indetectáveis do FT plasmático (50% e 80%, respectivamente) e por isso estes resultados foram analisados com base em valores detectáveis, usando o teste de Fisher. No grupo de pacientes sem uso de hidroxiuréia, 79% (11/14) dos pacientes tiveram níveis plasmáticos detectáveis do FT, em comparação com apenas 28% (5/18) dos pacientes em uso de hidroxiuréia ($p=0.01$) (Figura 7).

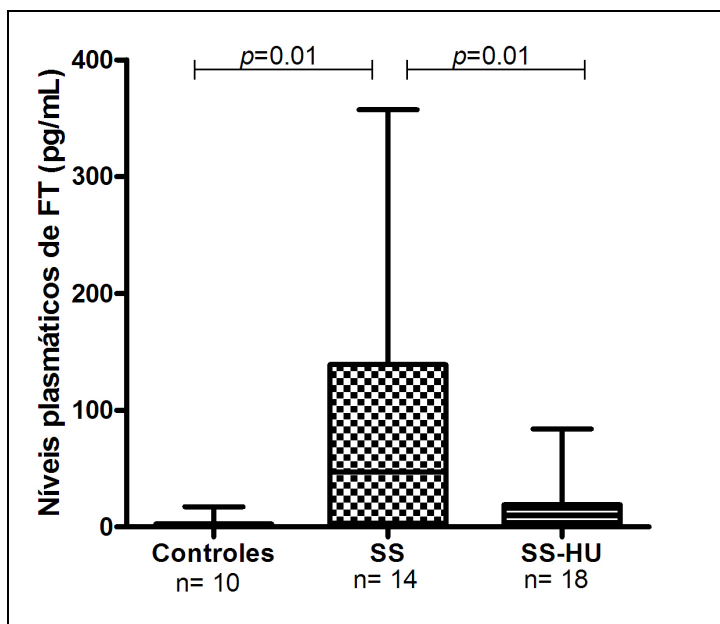


Figura 7 – Níveis plasmáticos do fator tecidual nos pacientes com anemia falciforme e controles. Os níveis plasmáticos do fator tecidual (FT) foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do FT em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

D. Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III

As consequências funcionais da redução da expressão do FT foram avaliadas pelas medições dos níveis plasmáticos dos marcadores indiretos de geração de trombina: TAT e F1+2. Os níveis plasmáticos de TAT estavam significativamente elevados em pacientes SS em comparação com

os controles normais (11.5[SS] vs. 2.4[controles], $p<0.0001$). O tratamento com hidroxiuréia esteve associado a uma redução significativa nos níveis plasmáticos de TAT (11.5[SS] vs. 7.5[SS-HU], $p=0.03$) (Figura 8 e Tabela 4).

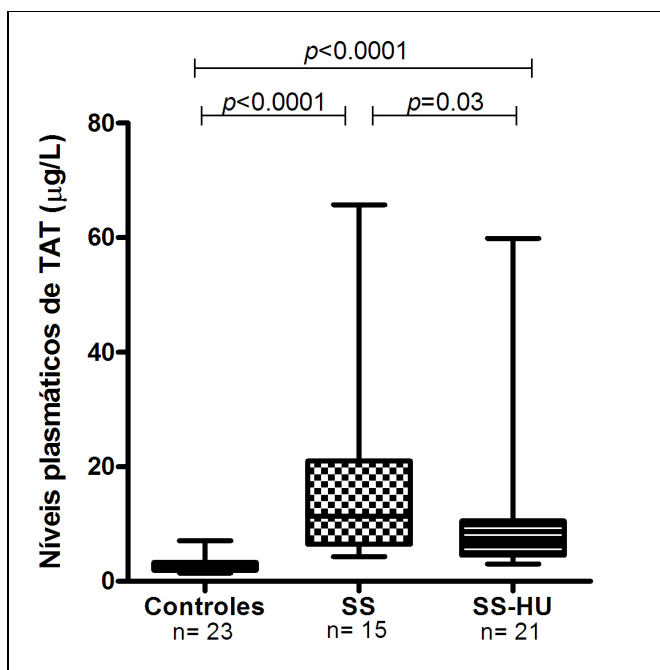


Figura 8 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com anemia falciforme e controles. Os níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III (TAT) foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TAT em µg/L. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p\leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

E. Níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina

Os valores plasmáticos do F1+2 foram significativamente maiores nos pacientes do que no grupo controle (301.5[SS] vs 145[controles], $p<0.0001$; 245[SS-HU] vs 145[controles], $p=0.002$). Ao compararmos o grupo de pacientes com e sem uso da hidroxiuréia podemos observar que o grupo sem uso da medicação apresenta valores de F1+2 maiores, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (301.5[SS] vs 245[SS-HU], $p=0.09$) (Figura 9 e Tabela 4). As reduções dos níveis de TAT e do F1+2 confirmam a relevância biológica da redução da expressão do FT nos pacientes em uso de hidroxiuréia.

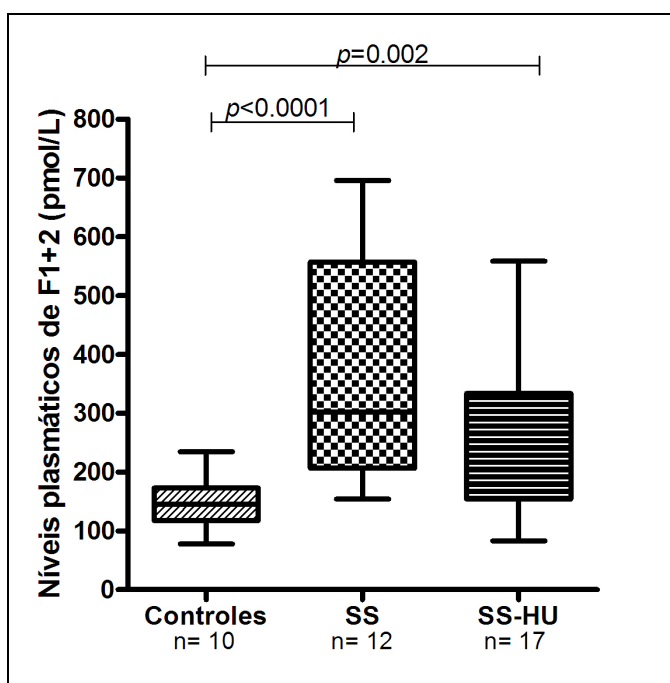


Figura 9 – Níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina nos pacientes com anemia falciforme e controles. Os níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos

do F1+2 em pmol/L. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

F. Níveis plasmáticos da trombosmodulina solúvel

A trombosmodulina solúvel é uma proteína endotelial que foi mensurada como marcador de ativação endotelial. Os pacientes sem uso de hidroxiuréia apresentam valores de trombosmodulina solúvel muito maiores do que o grupo controle (3.6[SS] vs 2.6[controles], $p=0.0007$) e o tratamento com hidroxiuréia resultou numa redução significativa nestes níveis (3.6[SS] vs 2.5[SS-HU], $p=0.0007$) (Figura 10 e Tabela 4).

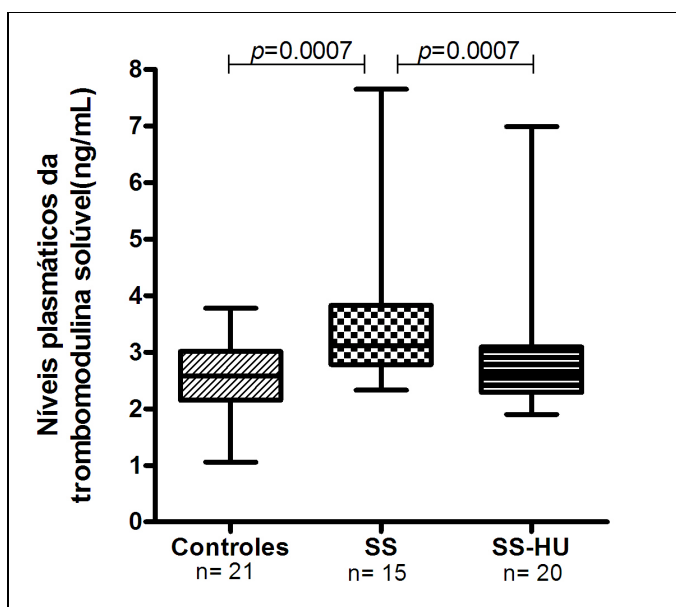


Figura 10 – Níveis plasmáticos da trombosmodulina solúvel nos pacientes com anemia falciforme e controles. Os níveis plasmáticos da trombosmodulina solúvel foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e

controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos da trombomodulina em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

G. Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α foi estudado como um marcador pró-inflamatório. Os pacientes sem uso de hidroxiuréia apresentam valores de TNF- α muito maiores do que o grupo controle (2.7[SS] vs 0[controles], $p < 0.0001$). Ao compararmos os dois grupos de pacientes verificamos que o tratamento com hidroxiuréia resultou numa redução significativa nos níveis de TNF- α (2.7[SS] vs 0.3[SS-HU], $p < 0.0001$) (Figura 11 e Tabela 4).

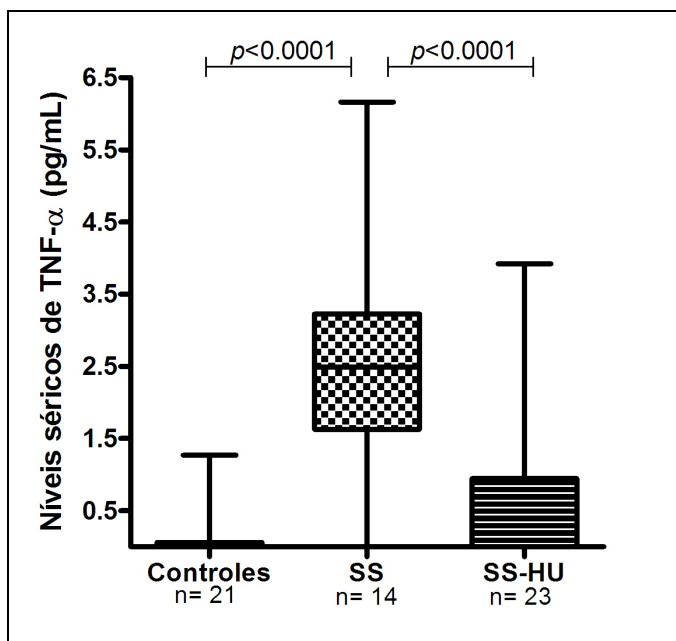


Figura 11 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com anemia falciforme e controles. Os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram quantificados por kit de ELISA ultrasensível nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TNF- α em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

O resumo dos resultados dos marcadores de ativação da coagulação, inflamação e ativação endotelial encontrados nos pacientes e controles estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da expressão do *fator tecidual*, marcadores de coagulação, ativação endotelial e inflamação nos controles e pacientes

	Controles		SS		SS-HU		<i>p</i> Controles vs. SS	<i>p</i> Controles vs. SS- HU	<i>p</i> SS vs. SS-HU
	n	Mediana (Percentil 25, 75)	n	Mediana (Percentil 25, 75)	n	Mediana (Percentil 25, 75)			
<i>FT</i> [†]	18	1.2 (0.5, 1.9)	12	5.0 (2.7, 7.7)	19	2.6 (1.8, 4.4)	0.0004	0.001	0.02
TAT (µg/mL)	23	2.4 (1.9, 3.3)	15	11.5 (8.0, 17.3)	21	7.5 (4.8, 10.8)	<0.0001	<0.0001	0.03
F1+2 (pmol/L)	10	145 (110, 176.8)	12	301.5 (246, 562)	17	245 (173.8, 352)	<0.0001	0.002	0.09
sTrombomodulina (ng/mL)	21	2.6 (2.2, 3)	15	3.6 (2.9, 4.3)	20	2.5 (2.2, 2.8)	0.0007	0.7	0.0007
TNF-α (pg/mL)	21	0 (0, 0.06)	14	2.7 (1.6, 3.7)	23	0.3 (0, 0.8)	<0.0001	0.09	<0.0001

Abreviações: *FT* - fator tecidual; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU - pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia; TAT – complexo trombina-antitrombina III; F1+2 – fragmento 1+2 da protrombina; sTrombomodulina - trombomodulina solúvel; TNF-α - fator de necrose tumoral alfa.

*Todos os valores de *p* foram calculados com o teste U de Mann-Whitney.

[†]*FT* expressão relativa de *fator tecidual* avaliada por PCRq.

H. Correlações dos marcadores da coagulação com os marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação

Nós avaliamos as correlações bivariadas entre os marcadores da coagulação (FT, TAT e F1+2) com os marcadores de hemólise (hemoglobina, hematócrito, LDH, bilirrubina indireta, contagem de reticulócitos) HbF, marcadores de inflamação (contagens de leucócitos, TNF- α) e ativação endotelial (trombomodulina solúvel). Para as análises de correlação, nós agrupamos os pacientes SS e SS-HU. A expressão relativa de *FT* apresentou correlações significativas com os níveis de HbF, hemoglobina, hematócrito, trombomodulina, TNF- α e contagem de neutrófilos (todos com $p \leq 0.05$). O TAT e F1+2 apresentaram correlações significativas com a HbF, hemoglobina e LDH (todos com $p \leq 0.05$). As correlações encontradas foram todas moderadas. De forma geral, a redução dos marcadores de hipercoagulabilidade estava associada a níveis mais elevados de HbF e redução dos marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação (Tabela 5).

Tabela 5- Correlações do *fator tecidual* e marcadores da coagulação com marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação

	FT^1 $r(p)^2$	TAT ($\mu\text{g/mL}$) $r(p)^2$	F1+2 (pmol/L) $r(p)^2$
sTrombomodulina (ng/mL)	0.48 (0.007)	0.03 (0.82)	0.2 (0.24)
TNF- α (pg/mL)	0.49 (0.005)	0.11 (0.47)	0.26 (0.13)
Hemoglobina fetal (%)	-0.36 (0.04)	-0.39 (0.01)	-0.29 (0.1)
Lactato desidrogenase (U/L)	0.25 (0.17)	0.33 (0.02)	0,47 (0.004)
Bilirrubina sérica indireta (mg/dL)	0.10 (0.55)	0.19 (0.21)	-0.01 (0.93)
Hemoglobina (g/dL)	-0.40 (0.02)	-0.33 (0.02)	-0.4 (0.01)
Hematócrito (%)	-0.47 (0.006)	-0.21 (0.15)	-0.27 (0.12)
Reticulócitos totais ($\times 10^9/\text{L}$)	0.15 (0.39)	0.27 (0.07)	0.17 (0.33)
Leucócitos totais ($\times 10^9/\text{L}$)	0.24 (0.18)	-0.04 (0.79)	0.21 (0.22)
Monócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.33 (0.06)	-0.02 (0.85)	0.03 (0.84)
Neutrófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.37 (0.03)	-0.02 (0.88)	0.24 (0.17)
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$)	-0.10 (0.58)	-0.06 (0.68)	0.03 (0.84)

Abreviações: FT – fator tecidual; TAT - complexo trombina anti-trombina III;

F1+2 - fragmento 1+2 da protrombina; sTrombomodulina– trombomodulina solúvel; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.

¹Expressão relativa do *FT* por PCRq.

²Coeficiente de correlação (r), teste de Spearman.

Para avaliarmos quais foram as variáveis mais importantes na redução da hipercoagulabilidade destes pacientes e para eliminar fatores de confusão, que ocorrem com uso de múltiplas associações, nós realizamos uma análise de regressão linear multivariada. Neste modelo a expressão de FT, TAT e F1+2 foram incluídos como variáveis dependentes, e o uso de hidroxiuréia, níveis de TNF- α , trombomodulina, HbF, LDH, bilirrubina indireta, reticulócitos, plaquetas, leucócitos totais e diferenciais foram as variáveis independentes. Quando a análise foi ajustada para o uso de hidroxiuréia, o uso de hidroxiuréia foi a única variável independente associada significativamente à

redução da expressão do *FT* ($\text{Beta(EP)} = -8.79(3.12)$, $p=0.009$, $R^2=0.23$) e do *TAT* ($\text{Beta(EP)}=-6.58(3.21)$, $p=0.05$, $R^2=0.13$). O *LDH* foi um fator independente associado a redução do *F1+2* ($\text{Beta(EP)}=0.36(0.17)$, $p=0.05$, $R^2=0.13$), mesmo após o ajuste para uso de hidroxiuréia.

I. Experimentos no modelo murino de anemia falciforme

Realizamos a quantificação dos níveis plasmáticos de *TAT* como marcador final da ativação da coagulação. O grupo tratado com hidroxiuréia apresentou uma redução significativa nos níveis de *TAT* (106.7[HU] vs.138.5[salina], $p=0.05$) (Figura 12).

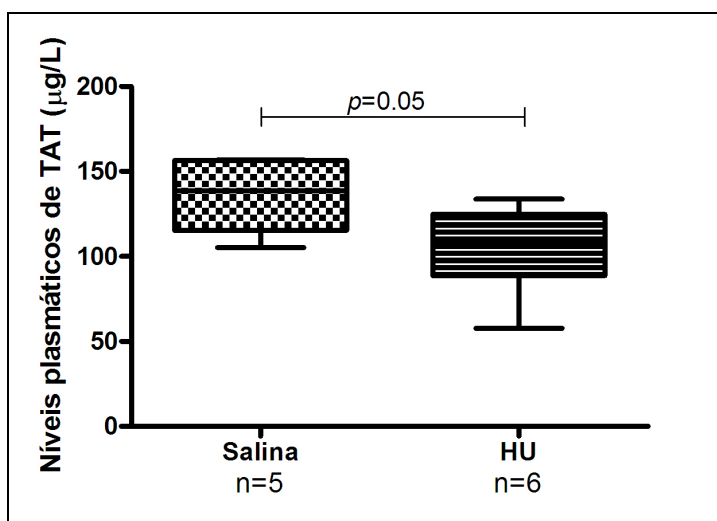


Figura 12 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em modelo murino de anemia falciforme. Os níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III (*TAT*) foram quantificados por kit de ELISA. Camundongos C57BL/6 receberam TCTH de camundongos Berkeley e foram tratados por 16 semanas com injeções intraperitoneais de hidroxiuréia ou salina. O número de animais incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do *TAT* em

µg/L. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: HU – animais tratados com hidroxiuréia.

Realizamos a quantificação dos níveis plasmáticos do marcador pró-inflamatório IL-6 nos animais tratados e não tratados com hidroxiuréia. O tratamento com hidroxiuréia resultou numa redução não significativa nos níveis de IL-6 (7.1[HU] vs. 12.4[salina], $p=0.2$) (Figura 13).

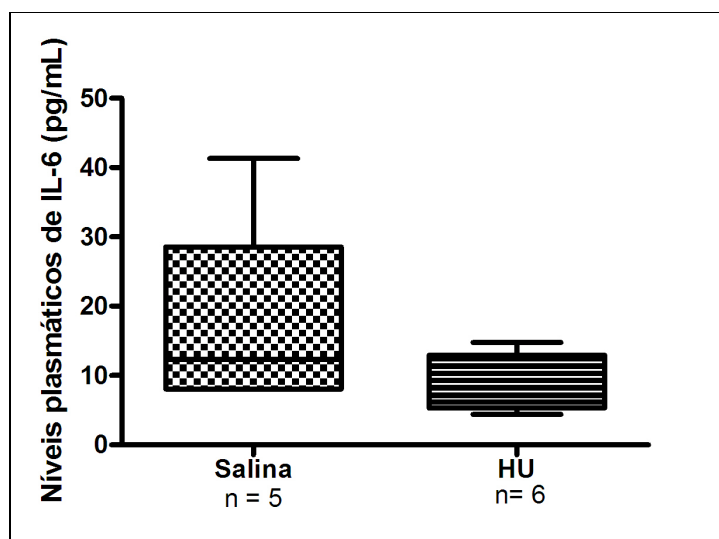


Figura 13 – Níveis plasmáticos da interleucina 6 em modelo murino de anemia falciforme. Os níveis plasmáticos da interleucina 6 (IL-6) foram quantificados por kit de ELISA. Camundongos C57BL/6 receberam TCTH de camundongos Berkeley e foram tratados por 16 semanas com injeções intraperitoneais de hidroxiuréia ou salina. O número de animais incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do IL-6 em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram

considerados significativos. Abreviações: HU – animais tratados com hidroxiuréia.

Os níveis plasmáticos de sVCAM-1 foram medidos para avaliar o grau de ativação endotelial presente nos animais tratados ou não com hidroxiuréia. O tratamento com a droga não resultou em diferença significativa nos níveis de sVCAM-1 (765.8[HU] vs. 848.4[salina], $p=0.4$) (Figura 14).

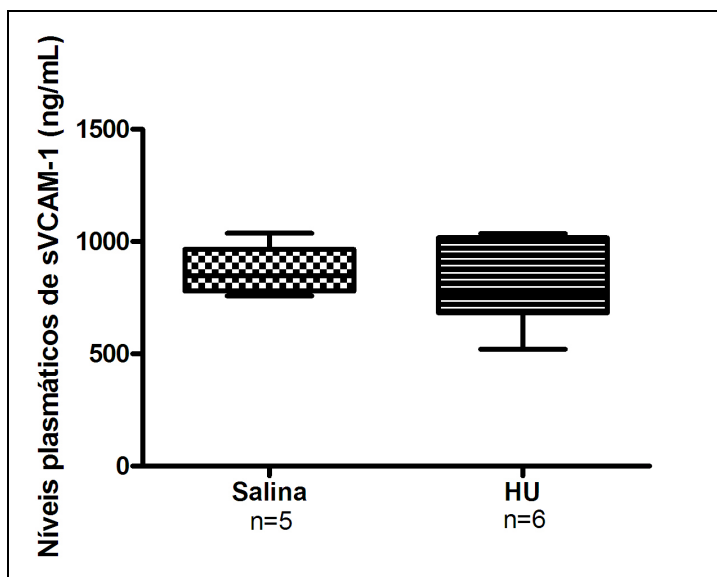


Figura 14 – Níveis plasmáticos da sVCAM-1 em modelo murino de anemia falciforme. Os níveis plasmáticos da sVCAM-1 foram quantificados por kit de ELISA. Camundongos C57BL/6 receberam TCTH de camundongos Berkeley e foram tratados por 16 semanas com injeções intraperitoneais de hidroxiuréia ou salina. O número de animais incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos de sVCAM-1 em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: HU – animais tratados com hidroxiuréia.

4.2. Parte 2 – Estudo do estado de hipercoagulabilidade na Hemoglobinopatia SC

A. Características dos pacientes incluídos

Foram incluídos na parte 2 do estudo um total de 56 pacientes portadores de HbSC (heterozigotos SC) e 65 pacientes portadores de AF (homozigotos SS). Para a parte 2 do estudo, incluímos todos os pacientes com AF da parte 1 e novos pacientes AF que foram atendidos em nossa Instituição durante o período do estudo. Os controles foram os mesmos da parte 1 do estudo. Os pacientes incluídos estavam em condição estável (sem crises, hospitalizações ou transfusões nos 3 meses precedentes). Dentre os pacientes com AF, 26 faziam uso de hidroxiuréia e 39 não faziam uso da medicação. Nenhum dos pacientes com HbSC fazia uso de hidroxiuréia. Em relação ao uso de aspirina, 7 pacientes com HbSC e 6 pacientes com AF faziam uso da medicação. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.

	SC n= 56	SS n =65	<i>p</i> ¹
<i>Características clínicas:</i>			
Idade (anos) ²	40 (33, 49)	37 (28, 44)	0.02
Sexo: Masculino/Feminino ³	25(45)/ 31(55)	18(28)/ 47(72)	0.06
Traço α -talassêmico ^{3,4}	14 (33)	14 (27)	0.65
<i>Complicações clínicas:</i> ³			
- Crises álgicas de repetição ⁵	1 (2)	12 (32)	<0.0001
- Síndrome torácica aguda	7 (12)	11 (18)	0.45
- Acidente vascular cerebral	2 (4)	10 (16)	0.03
- Úlceras venosas	2 (4)	9 (15)	0.06
- Retinopatia	32 (65)	21 (39)	0.01
- Osteonecrose	22 (42)	12 (20)	0.01
<i>Características laboratoriais</i> ² :			
Lactato desidrogenase (U/L)	453 (403,571)	877 (695,1147)	<0.0001
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1.0 (0.8, 1.3)	2.3 (1.4, 4.0)	<0.0001
Hemoglobina (g/dL)	12 (10.1, 12.9)	8.3 (7.2, 9.2)	<0.0001
Hematócrito (%)	34 (30.4, 37.3)	23.8 (20.8, 27)	<0.0001
Volume corpuscular médio (fL)	78 (74, 83)	96 (88, 112)	<0.0001
Contagem de reticulócitos (x10 ⁹ /L)	177.5 (137, 251)	257.7 (155, 401)	0.001
Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L)	8.1 (6.6, 9.8)	9.1 (7.3, 11.8)	0.06
Contagem de neutrófilos (x10 ⁹ /L)	4.7 (3.4, 5.9)	4.4 (3.0, 5.9)	0.45
Contagem de monócitos (x10 ⁹ /L)	0.5 (0.3, 0.7)	0.8 (0.5, 1.2)	<0.0001
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /L)	343 (185, 439)	419 (324, 484)	0.003

Abreviações: SC – hemoglobinopatia SC; SS – anemia falciforme.

¹As idades dos pacientes e os dados laboratoriais foram comparados com o teste U de Mann-Whitney. As demais características clínicas foram comparadas usando o teste de Fisher.

²Dados representados como: mediana (percentis 25, 75).

³Dados representados como: número (%).

⁴Traço α -talassêmico: deleção -3.7kb (- α 3.7). Os resultados estavam disponíveis para 43 pacientes no grupo SC e 52 pacientes no grupo AF.

⁵Crises álgicas de repetição foram definidas como presença de três ou mais crises por ano.

B. Expressão relativa do *fator tecidual*

O PCRq evidenciou um aumento na expressão relativa do *FT* em pacientes HbSC em comparação com os controles normais (2.6[SC] vs. 1.2[controles], $p=0.003$), tendo níveis semelhantes aos encontrados em pacientes AF (2.6[SC] vs. 3.1[SS + SS-HU], $p=0.2$) (Figura 15). Ao compararmos os pacientes HbSC com os dois grupos de pacientes AF, verificamos que os pacientes com HbSC apresentaram níveis de *FT* inferiores aos vistos nos pacientes SS (2.6[SC] vs. 3.4[SS], $p=0.04$), e semelhante ao visto em pacientes SS-HU (2.6[SC] vs. 2.6[SS-HU], $p=0.9$). (Figura 16 e Tabela 7).

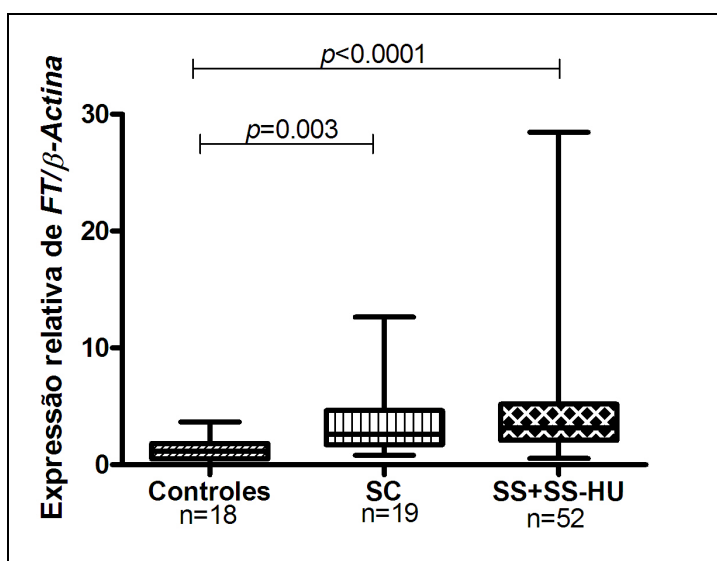


Figura 15 - Expressão relativa do *fator tecidual* nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles. A expressão relativa do gene do *fator tecidual* (*FT*) foi estudada por PCRq em cDNA de leucócitos totais em pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores relativos da expressão do *FT*/ β -Actina. As comparações entre os grupos foram realizadas

pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS - pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

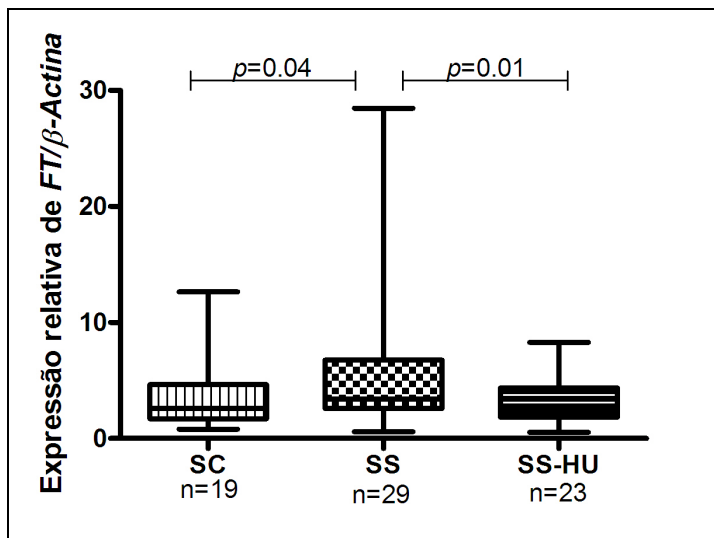


Figura 16 - Expressão relativa do *fator tecidual* nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com ou sem uso de hidroxiuréia. A expressão relativa do gene do *fator tecidual* (*FT*) foi estudada por PCRq em cDNA de leucócitos totais em pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores relativos da expressão do *FT/β-Actina*. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

C. Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III

As consequências funcionais da expressão do FT foram avaliadas pelas medições dos níveis plasmáticos dos marcadores indiretos de geração de trombina: o TAT e o D-dímero. Os níveis plasmáticos de TAT estavam significativamente elevados em pacientes HbSC em comparação com os controles normais (4.2[SC] vs. 2.4[controles], $p<0.0001$), porém em níveis menores do que vistos em pacientes com AF (4.2[SC] vs. 7.4[SS+SS-HU], $p<0.0001$) (Figura 17). Ao compararmos os pacientes HbSC com os dois grupos de pacientes AF, verificamos que os pacientes com HbSC apresentam níveis de TAT inferiores aos vistos em ambos os grupos de pacientes AF, os sem uso de hidroxiuréia (4.2[SC] vs. 9.5[SS], $p<0.0001$), e com uso da droga (4.2[SC] vs. 6.0[SS-HU], $p=0.01$). (Figura 18 e Tabela 7).

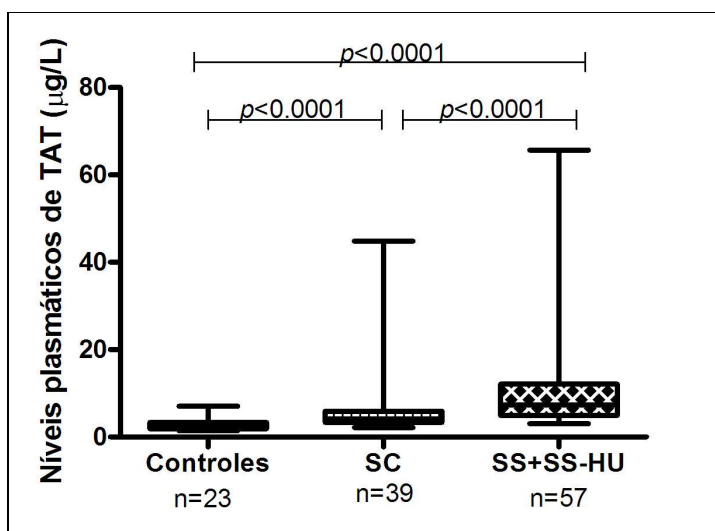


Figura 17 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles.

Os níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III (TAT) foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de

pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TAT em $\mu\text{g/L}$. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

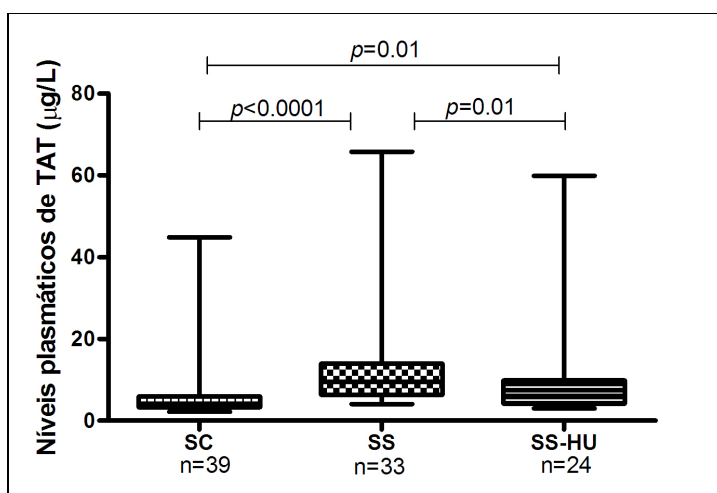


Figura 18 – Níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III em pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia. Os níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III (TAT) foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TAT em $\mu\text{g/L}$. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com

hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

D. Níveis plasmáticos do D-dímero

Os níveis plasmáticos do D-dímero estavam significativamente elevados nos portadores de HbSC quando comparados aos controles normais (710.4[SC] vs. 150.2[controles], $p<0.0001$), porém em níveis inferiores aos presentes na AF (710.4[SC] vs. 1495[SS+SS-HU], $p=0.0003$) (Figura 19). Os níveis do D-dímero nos pacientes com HbSC eram inferiores aos vistos nos pacientes SS (710.4[SC] vs. 1643[SS], $p=0.0004$) e semelhantes aos níveis nos pacientes SS-HU (710.4[SC] vs. 1243[SS-HU], $p=0.1$) porém esta avaliação estava prejudicada pelo baixo número de pacientes SS-HU (Figura 20 e Tabela 7).

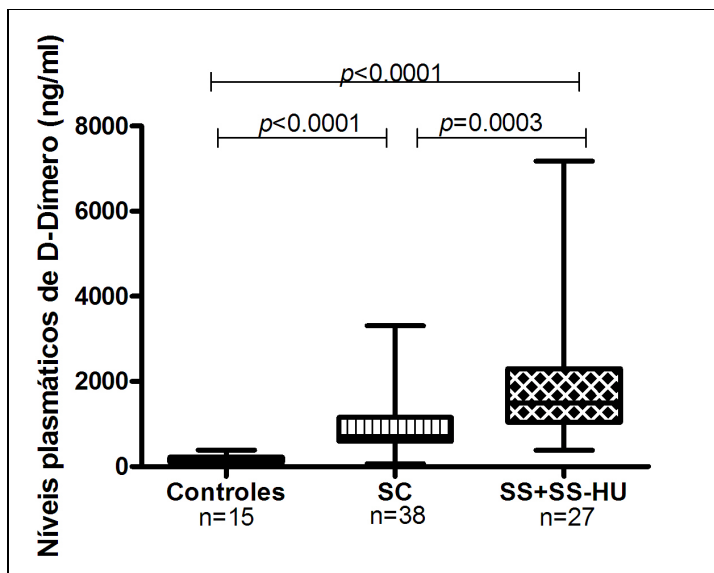


Figura 19 – Níveis plasmáticos do D-dímero em pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles. Os níveis

plasmáticos do D-dímero foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do D-dímero em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

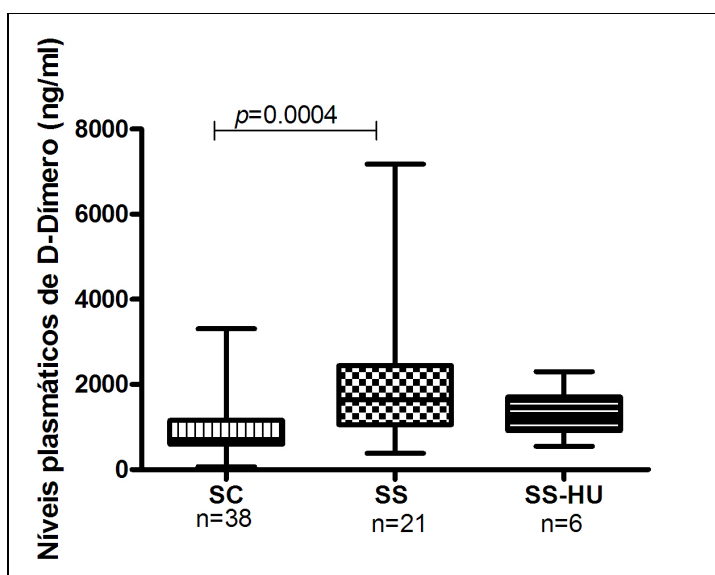


Figura 20 – Níveis plasmáticos do D-dímero em pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia. Os níveis plasmáticos do D-dímero foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do D-dímero em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados

significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

E. Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel

A trombomodulina solúvel foi mensurada como marcador de ativação endotelial. Os pacientes com HbSC apresentam valores de trombomodulina solúvel significativamente maiores do que o grupo controle (3.2[SC] vs. 2.6[controles], $p=0.004$), em valores semelhantes aos encontrados na AF (3.2[SC] vs. 3.0[SS+SS-HU], $p=0.6$) (Figura 21). Os níveis da trombomodulina solúvel nos pacientes com HbSC eram semelhantes aos vistos nos pacientes SS (3.2[SC] vs. 3.5[SS], $p=0.1$) e mais altos do que os níveis nos pacientes SS-HU (3.2[SC] vs. 2.4[SS-HU], $p=0.004$) (Figura 22 e Tabela 7).

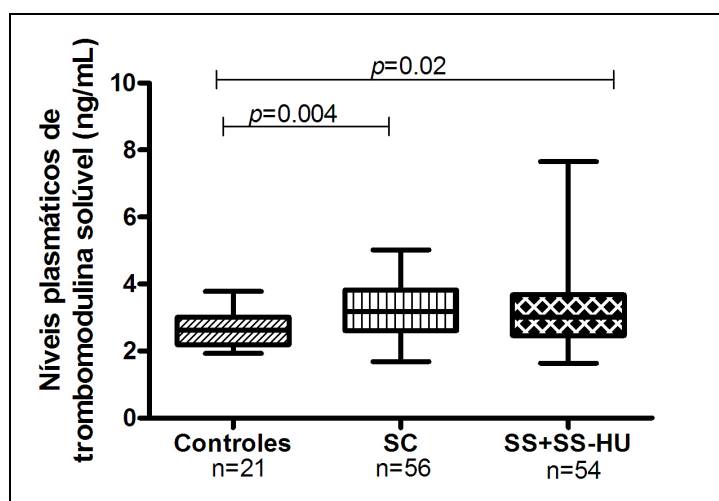


Figura 21 – Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles. Os

níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos da trombomodulina em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

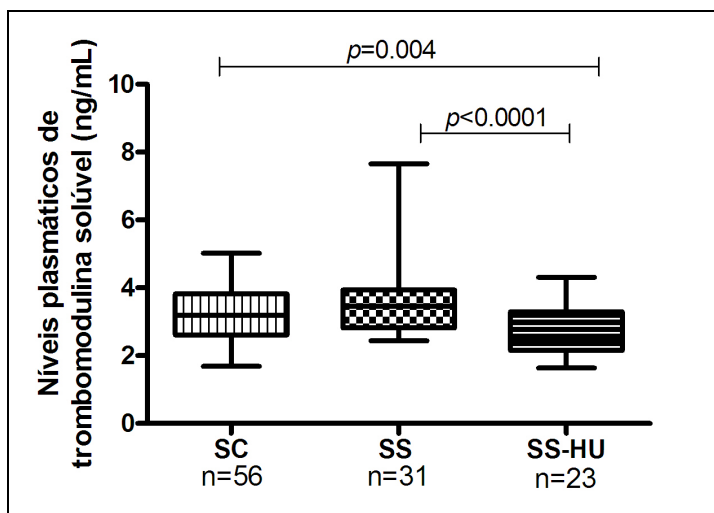


Figura 22 – Níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia. Os níveis plasmáticos da trombomodulina solúvel foram quantificados por kit de ELISA nos pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos da trombomodulina em ng/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$

foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

F. Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α foi estudado como um marcador pró-inflamatório. Os níveis séricos do TNF- α estavam significativamente elevados nos pacientes com HbSC em comparação com controles normais (2.7[SC] vs. 0[controles], $p<0.0001$), estando em níveis semelhantes aos encontrados na AF (2.7[SC] vs. 2.2[SS+SS-HU], $p=0.5$) (Figura 23). Os pacientes com HbSC apresentavam níveis de TNF- α semelhantes aos dois grupos de pacientes com AF, sem uso de hidroxiuréia (2.7[SC] vs. 2.7[SS], $p=1.0$) e com uso da medicação (2.7[SC] vs. 1.7[SS-HU], $p=0.2$) (Figura 24 e Tabela 7).

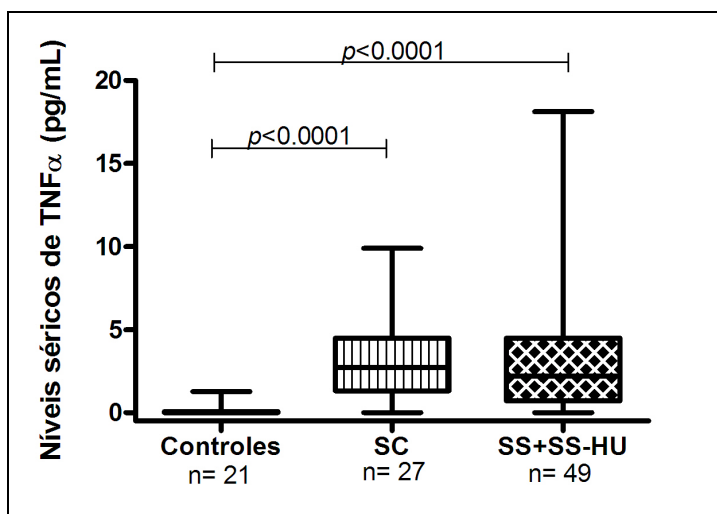


Figura 23 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles. Os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram quantificados

por kit de ELISA ultrasensível nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TNF- α em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

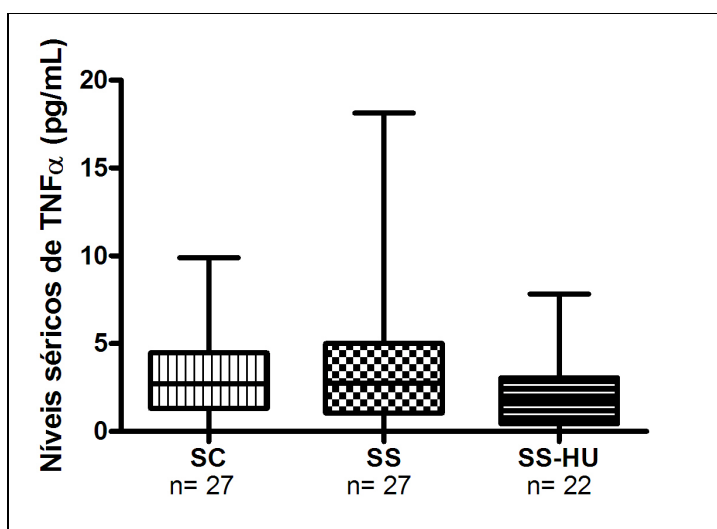


Figura 24 – Níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia. Os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram quantificados por kit de ELISA ultrasensível nos pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos do TNF- α em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com

hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

G. Níveis séricos da interleucina 8

A IL-8 também foi avaliada como marcador pró-inflamatório. Os níveis séricos da IL-8 estavam discretamente elevados nos pacientes com HbSC em relação aos controles, porém sem atingir significância estatística (2.5[SC] vs. 2.3[controles], $p=0.2$). Os pacientes com HbSC apresentaram níveis de IL-8 inferiores aos encontrados na AF (2.5[SC] vs. 3.2[SS+SS-HU], $p=0.05$) (Figura 25). Ao compararmos os pacientes com HbSC com os dois grupos de pacientes com AF, os níveis de IL-8 foram semelhantes aos vistos nos pacientes SS (2.5[SC] vs. 2.8[SS], $p=0.5$), e inferiores aos níveis encontrados nos pacientes SS-HU (2.5[SC] vs. 3.8[SS-HU], $p=0.007$) (Figura 26 e Tabela 7).

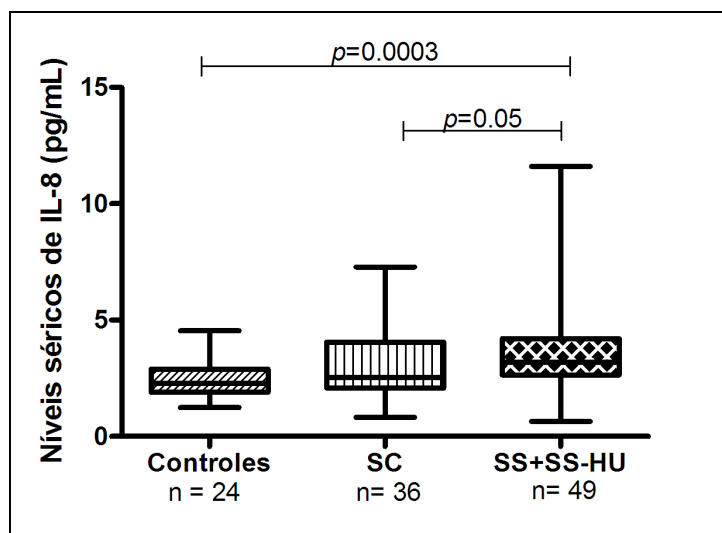


Figura 25 – Níveis séricos da interleucina 8 nos pacientes com hemoglobinopatia SC, anemia falciforme e controles. Os níveis séricos da

interleucina 8 (IL-8) foram quantificados por kit de ELISA ultrasensível nos pacientes e controles. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos da IL-8 em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia.

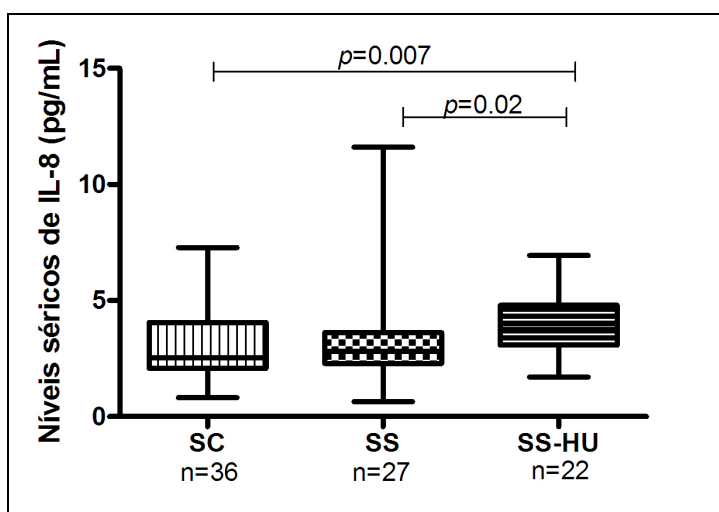


Figura 26 – Níveis séricos da interleucina 8 nos pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia. Os níveis séricos da interleucina 8 (IL-8) foram quantificados por kit de ELISA ultrasensível nos pacientes. O número de pacientes incluídos em cada experimento está indicado na figura. O eixo y indica os valores plasmáticos da IL-8 em pg/mL. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste U de Mann Whitney e valores de $p \leq 0.05$ foram

considerados significativos. Abreviações: SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU – pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia.

O resumo dos resultados dos marcadores de ativação da coagulação, inflamação e ativação endotelial encontrados nos pacientes HbSC e AF e controles estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da expressão do *fator tecidual*, marcadores de coagulação, ativação endotelial e inflamação nos controles, pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme

	n	Controles Mediana (Percentil 25, 75)	n	SC Mediana (Percentil 25, 75)	n	SS +SS-HU Mediana (Percentil 25, 75)	n	SS Mediana (Percentil 25, 75)	n	SS-HU Mediana (Percentil 25, 75)	p* SC vs. Controles	p* SC vs. SS+SS- HU	p* SC vs. SS	p* SC vs. SS-HU
<i>FT</i> [†]	18	1.2 (0.5, 1.9)	19	2.6 (1.7, 4.6)	52	3.1 (2.1, 5.2)	29	3.4 (2.6, 6.8)	23	2.6 (1.8, 4.4)	0.003	0.2	0.04	0.9
TAT (µg/mL)	23	2.4 (1.9, 3.3)	39	4.2 (3.3, 5.9)	57	7.4 (5.0, 12.1)	33	9.5 (6.4, 13.9)	24	6.0 (4.2, 9.8)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.01
D-dímero (ng/mL)	15	150 (104, 225)	38	710 (596, 1155)	27	1495 (1041, 2305)	21	1643 (1058, 2440)	6	1243 (918, 1713)	<0.0001	0.0003	0.0004	0.1
sTM (ng/mL)	21	2.6 (2.2, 3.0)	56	3.2 (2.6, 3.8)	54	3.0 (2.5, 3.7)	31	3.5 (2.8, 3.9)	23	2.4 (2.2, 3.3)	0.004	0.6	0.1	0.004
TNF-α (pg/mL)	21	0 (0, 0.06)	27	2.7 (1.3, 4.5)	49	2.2 (0.7, 4.5)	27	2.7 (1.1, 5.0)	22	1.7 (0.4, 3.1)	<0.0001	0.5	1.0	0.2
IL-8 (pg/mL)	24	2.3 (1.9, 2.9)	36	2.5 (2.1, 4.1)	49	3.2 (2.6, 4.2)	27	2.8 (2.3, 3.6)	22	3.8 (3.1, 4.8)	0.2	0.05	0.5	0.007

Abreviações: *FT* - fator tecidual; SC – pacientes com hemoglobinopatia SC; SS – pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia; SS-HU - pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia; TAT – complexo trombina-antitrombina III; F1+2 – fragmento 1+2 da protrombina; sTM - trombomodulina solúvel; TNF-α - fator de necrose tumoral alfa; IL-8 – interleucina 8.

*Todos os valores de *p* foram calculados com o teste U de Mann-Whitney.

[†]*FT* expressão relativa de *fator tecidual* avaliada por PCRq.

H. Correlações dos marcadores da coagulação com os marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação na HbSC

Ao analisarmos a coorte de pacientes com HbSC, avaliamos as correlações bivariadas entre os marcadores da coagulação (*FT*, TAT e D-dímero) com os marcadores de hemólise (hemoglobina, hematócrito, LDH, bilirrubina indireta, contagem de reticulócitos), marcadores de inflamação (contagens de leucócitos, TNF- α e IL-8) e ativação endotelial (trombomodulina solúvel). A expressão relativa de *FT* apresentou correlação significativa com a contagem de monócitos ($p=0.01$). O TAT e D-dímero apresentaram correlações significativas com LDH, contagem de reticulócitos e de monócitos (todos com $p\leq 0.05$). O TAT apresentou também correlações com contagens de leucócitos e plaquetas (ambos com $p\leq 0.05$). As correlações foram todas moderadas. De forma geral, a elevação dos marcadores de hipercoagulabilidade estava associada a níveis mais elevados dos marcadores de hemólise e de inflamação (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlações dos marcadores da coagulação com marcadores de hemólise, ativação endotelial e inflamação na hemoglobinopatia SC

	FT^1 $r(p)^2$	TAT ($\mu\text{g/mL}$) $r(p)^2$	DD (ng/mL) $r(p)^2$
sTrombomodulina (ng/mL)	0.05 (0.82)	-0.21 (0.20)	-0.21 (0.19)
IL-8 (pg/mL)	0.22 (0.42)	0.36 (0.06)	0.07 (0.76)
TNF- α (pg/mL)	0.43 (0.30)	0.03 (0.88)	-0.07 (0.76)
Lactato desidrogenase (U/L)	-0.06 (0.81)	0.63 (<0.0001)	0.50 (0.001)
Bilirrubina sérica indireta (mg/dL)	-0.02 (0.94)	0.20 (0.28)	0.01 (0.99)
Hemoglobina (g/dL)	0.17 (0.48)	-0.26 (0.11)	0.06 (0.72)
Hematócrito (%)	0.22 (0.36)	-0.30 (0.06)	-0.02 (0.89)
Reticulócitos totais ($\times 10^9/\text{L}$)	0.18 (0.46)	0.40 (0.01)	0.45 (0.004)
Leucócitos totais ($\times 10^9/\text{L}$)	0.14 (0.57)	0.50 (0.001)	0.20 (0.21)
Monócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.55 (0.01)	0.39 (0.01)	0.32 (0.04)
Neutrófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	-0.03 (0.88)	0.20 (0.22)	0.06 (0.73)
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$)	0.36 (0.13)	0.49 (0.001)	0.19 (0.24)

Abreviações: FT – fator tecidual; TAT - complexo trombina anti-trombina III; DD – D-dímero; sTrombomodulina– trombomodulina solúvel; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-8: interleucina 8.

¹Expressão relativa do *FT* por PCRq.

²Coeficiente de correlação (r), teste de Spearman.

I. Associações entre os marcadores da coagulação e complicações clínicas crônicas

Na coorte com HbSC, nós avaliamos se haviam associações entre os marcadores da coagulação (*FT*, TAT, D-dímero) e a ocorrência de complicações clínicas crônicas. Nesta análise comparamos os níveis de cada marcador na presença e ausência das seguintes complicações clínicas: AVCi, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, úlceras

cutâneas, retinopatia, osteonecrose, microalbuminúria e auto-esplenectomia. Não encontramos nenhuma associação entre a expressão relativa de *FT* e complicações clínicas. Os níveis de D-dímero estavam mais elevados nos pacientes com HbSC com retinopatia, em comparação com pacientes sem esta complicação (852 vs. 600, $p=0.01$). Encontramos níveis mais elevados de TAT nos pacientes portadores de retinopatia (4.6 vs. 3.9, $p=0.04$) e osteonecrose (4.6 vs. 3.9, $p=0.04$). Os pacientes com auto-esplenectomia apresentaram níveis mais altos de TAT (4.8 vs. 3.8, $p=0.005$) e D-dímero (870 vs. 616, $p=0.006$). Auto-esplenectomia foi definida como ausência do baço visualizável por ultra-sonografia abdominal. A presença de algumas complicações clínicas como AVCi, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar e úlceras cutâneas, apresentavam uma prevalência muito baixa nesta coorte, o que pode ter prejudicado estas análises.

5. DISCUSSÃO

O FT é o principal iniciador fisiológico da coagulação in vivo. O FT é o receptor celular e cofator do fator VII da coagulação. O complexo TF:FVIIa numa superfície que contenha fostaditilserina causa ativação do fator X e IX, iniciando uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a formação de trombina, trombo de fibrina e ativação plaquetária. Sob condições normais o FT é expresso nas células da camada adventícia da parede vascular, sendo exposto na circulação após a ocorrência de lesões vasculares, desencadeando então a ativação da coagulação (Mackman 2009). O FT também é constitucionalmente expresso em concentrações muito pequenas por monócitos (Egorina et al. 2005; Osterud 2010), e esta expressão é aumentada em várias condições patológicas, especialmente em estados pró-inflamatórios, tais como sepse (Brand et al. 1991; Egorina et al. 2005). Existe um debate se outras células do sangue também podem expressar FT, mas é quase certo que os monócitos são as únicas células do sangue capazes de sintetizar o FT (Osterud et al. 2000; Osterud 2010). Em condições patológicas os monócitos podem transferir FT para granulócitos e plaquetas através de micropartículas (Egorina et al. 2008).

Nossos resultados demonstram um aumento na expressão de FT em mRNA de leucócitos totais e aumento dos níveis plasmáticos da proteína do FT nesta coorte de pacientes com AF. Nossas medições de mRNA de FT e os níveis plasmáticos do antígeno do FT podem refletir a expressão de FT pelos leucócitos, incluindo (ou exclusivamente) os monócitos, e FT presentes em micropartículas circulantes, respectivamente. A confirmação da relevância biológica do aumento da expressão do FT é vista pelo aumento nos níveis plasmáticos do TAT e F1+2, marcadores finais da ativação da trombina,

demonstrando que a expressão do FT resultou na ativação da coagulação. Estudos anteriores em AF demonstraram um aumento da atividade pró-coagulante do FT em células mononucleares (Key et al. 1998) e expressão de FT em micropartículas (Shet et al. 2003), monócitos (Setty et al. 2012) e em células endoteliais circulantes (Solovey et al. 1998). Estudos em camundongos falciformes demonstraram expressão de FT em células endoteliais de veias pulmonares (Solovey et al. 2004). De forma importante, foi demonstrado em camundongos falciformes que o FT é o principal fator responsável pelo desencadeamento da ativação da coagulação, pois a inibição da expressão do FT reduz os níveis de TAT para valores normais (Chantrathammachart et al. 2012).

Prevendo os benefícios clínicos que poderiam ser obtidos por amenizar a hipercoagulabilidade observada na AF, estudos anteriores têm tentado inibir a expressão do FT usando vários agentes farmacológicos. Em estudos com camundongos falciformes, tratamentos com óxido nítrico, lovastatina (Solovey et al. 2004; Solovey et al. 2010) e derivados de ácido hidroxâmico (didox e trimidox) (Kaul et al. 2006), foram capazes de inibir a expressão de FT nas células endoteliais das veias pulmonares. Sulfassalazina foi testado em pacientes com AF, mas embora tenha sido capaz de reduzir a expressão de VCAM, ICAM e E-selectina por células endoteliais circulantes, não foi capaz de inibir a expressão de FT (Solovey et al. 2001).

Alguns estudos clínicos sugerem que a hidroxiuréia tenha um impacto clínico em melhorar o estado de hipercoagulabilidade na AF. O tratamento com hidroxiuréia tem sido associado a redução nas taxas de recorrência de

AVCi e diminuição nas velocidades do Doppler transcraniano em crianças com AF (Ware et al. 1999; Ware et al. 2004; Zimmerman et al. 2007; Ware and Helms 2012) além de redução na prevalência de hipertensão pulmonar em adultos com AF (Ataga et al. 2006). Existem também alguns indícios laboratoriais indicando um possível efeito benéfico da hidroxiuréia na hipercoagulabilidade. Em pacientes com neoplasias mieloproliferativas foi demonstrado que a hidroxiuréia é capaz de inibir a expressão de FT por leucócitos polimorfonucleares (Maugeri et al. 2006). Em pacientes com AF foram vistos associações entre a terapia com hidroxiuréia e redução dos níveis de D-dímero, micropartículas (Westerman et al. 2008) e TAT (Ataga et al. 2012). Estudos anteriores demonstraram uma redução da ativação e das propriedades adesivas de plaquetas em pacientes tratados com hidroxiuréia (Proenca-Ferreira et al. 2010).

O principal achado do presente estudo é que o tratamento com hidroxiuréia está associado a uma redução significativa na expressão de FT em pacientes com AF. Demonstramos uma inibição na expressão gênica do FT em leucócitos totais e diminuição dos níveis plasmáticos da proteína do FT. Mostramos também que pacientes tratados com hidroxiuréia apresentam uma redução nos níveis de TAT e F1+2, marcadores finais da ativação da coagulação. A expressão do FT, do TAT e do F1+2 foram inversamente proporcionais aos níveis de HbF, ou seja, quanto maiores os níveis de HbF menores os níveis de FT, TAT e F1+2. A HbF é o principal marcador laboratorial da ação da hidroxiuréia. Em conjunto estes resultados fornecem evidências biológicas da associação entre a terapia com hidroxiuréia e a inibição da ativação da coagulação em pacientes com AF. É importante

observar que os resultados foram obtidos em um estudo transversal ao invés de estudo longitudinal. Os pacientes em uso de hidroxiuréia apresentavam uma história de um fenótipo mais grave do que os doentes sem uso da droga, o que poderia, por conseguinte, ter subestimado, ao invés de superestimado, as diferenças encontradas.

A hidroxiuréia tem uma série de efeitos benéficos que poderiam ter contribuído para a redução da hipercoagulabilidade na AF. Em primeiro lugar, ao elevar os níveis de HbF o uso da hidroxiuréia causa importante melhora na anemia hemolítica, tendo uma série de benefícios. Ocorre aumento nos níveis de hemoglobina, aumento do volume eritrocitário, redução da desidratação eritrocitária e redução da exposição de fosfatidilserina nos eritrócitos (Bridges et al. 1996; Covas et al. 2004). O percentual de glóbulos vermelhos densos e desidratados, com alta tendência de polimerização e falcização, diminui expressivamente com o uso da droga (Bartolucci et al. 2012). Além disso, a hidroxiuréia reduz a expressão de moléculas de adesão eritrocitárias (Styles et al. 1997; Gambero et al. 2007; Odievre et al. 2008). Recentemente, um estudo em crianças com AF demonstrou que o tratamento com hidroxiuréia se associou a uma redução na quantidade total de micropartículas no plasma, principalmente às custas de redução de micropartículas derivadas de plaquetas e eritrócitos (Nebor et al. 2013).

No presente estudo, nossas análises de correlação indicam que a inibição da expressão de FT, TAT e F1+2 foi proporcional ao aumento dos níveis de hemoglobina e hematócrito. Os marcadores de geração de trombina também mostraram fortes correlações positivas com LDH, considerado um biomarcador de hemólise intravascular na AF (Kato et al. 2006; Chen et al.

2011). Esses achados corroboram a hipótese da associação causal entre a anemia hemolítica e a ativação da coagulação. Nossos resultados estão em acordo com a literatura. Um recente estudo em crianças com DF que demonstrou uma associação significativa entre a expressão e atividade do FT e TAT com marcadores de hemólise (contagem de reticulócitos e níveis de LDH) (Setty et al. 2012). Os autores do estudo sugeriram que estes achados apoiam o papel do uso precoce de agentes como a hidroxiuréia para reduzir a atividade hemolítica da doença como forma de evitar ou minimizar as alterações da coagulação, o que foi demonstrado pela primeira vez em nosso trabalho. Em estudos com adultos portadores de DF também foi visto uma associação entre os marcadores de geração de trombina (TAT, F1+2 e D-dímero) com marcadores de hemólise (hemoglobina e LDH) (Ataga et al. 2008; Ataga et al. 2012).

Nossa coorte de pacientes com AF tratados com hidroxiuréia apresentaram uma redução significativa nos níveis de TNF- α , nas contagens de leucócitos, monócitos e neutrófilos, demonstrando, assim, um importante efeito anti-inflamatório da droga. Diversos estudos anteriores demonstraram as múltiplas propriedades anti-inflamatórias da hidroxiuréia. O seu uso causa uma redução na contagem de leucócitos e plaquetas, diminuição das propriedades adesivas dos leucócitos, redução dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias e aumento nos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Benkerrou et al. 2002; Conran et al. 2007; Conran et al. 2007; Canalli et al. 2008; Lanaro et al. 2009; Almeida et al. 2012). Adicionalmente, a hidroxiuréia é capaz de reduzir a ativação e adesividade plaquetária (Proenca-Ferreira et al. 2010). Conforme discutido anteriormente, o estado

pró-inflamatório presente na AF tem provavelmente um papel importante na patogênese da ativação hemostática. Nossas análises de correlação apoiam esta hipótese, uma vez que encontramos uma forte correlação positiva entre a expressão de FT e os marcadores inflamatórios TNF- α e contagem de neutrófilos.

Os benefícios associados ao uso da hidroxiuréia vão além dos seus efeitos na hemólise e na inflamação. A hidroxiuréia também causa uma importante melhora na disfunção endotelial. Ela é uma droga que age diretamente como doadora de óxido nítrico e estimula a expressão da NO sintase endotelial (Gladwin et al. 2002; Cokic et al. 2008; Conran and Costa 2009). Redução da depleção de NO, da hemólise e da falcização são todos efeitos benéficos que contribuem para a melhora na disfunção endotelial. Achados indiretos que corroboram essa hipótese são a redução dos níveis plasmáticos de moléculas solúveis de adesão endotelial sVCAM-1, sICAM-1, sE-selectina e sP-selectina vistos em pacientes em uso de hidroxiuréia (Saleh et al. 1999; Conran et al. 2004; Kato et al. 2005). No presente estudo demonstramos que o tratamento com hidroxiuréia resultou em redução dos níveis plasmáticos de trombomodulina solúvel, um marcador de ativação endotelial. A melhora da ativação endotelial pode ter contribuído para a redução da hipercoagulabilidade nestes pacientes, uma vez que a ativação endotelial está diretamente associada ao desenvolvimento do estado de hipercoagulabilidade. Em concordância com esta hipótese, encontramos uma forte correlação positiva entre a expressão de FT e os níveis de trombomodulina solúvel.

Hemólise, ativação endotelial e inflamação são vias intimamente interligadas entre si e associadas à ativação da coagulação. A hidroxiuréia é uma droga capaz de modular todas estas vias e possivelmente todos estes mecanismos contribuem para o efeito inibitório que a hidroxiuréia tem na ativação da coagulação. De forma interessante, nas nossas análises de regressão multilinear, o tratamento com hidroxiuréia foi um fator independente na inibição da expressão do FT e na redução dos níveis de TAT. Este achado poderia implicar que a hidroxiuréia tenha um efeito inibitório direto na expressão do FT e na ativação da coagulação, que é independente do efeito da droga na hemólise, inflamação e ativação endotelial (Figura 27). Nossos resultados no modelo murino de AF também corroboram esta hipótese. Neste modelo animal verificamos que o tratamento prolongado com hidroxiuréia resultou numa redução significativa no marcador da ativação da coagulação, o TAT. Este é um modelo onde o uso da hidroxiuréia não resulta em expressão aumentada de HbF e não há nenhuma melhora na anemia hemolítica (Lebensburger et al. 2010). Em nossos resultados também não encontramos uma melhora significativa nos marcadores de inflamação ou ativação endotelial. Sendo assim, a melhora no marcador pró-coagulante ocorreu na ausência da indução da HbF, e na ausência de melhora na hemólise, inflamação ou ativação endotelial. Esses resultados sugerem que a hidroxiuréia tenha uma ação direta inibindo a ativação da coagulação na AF.

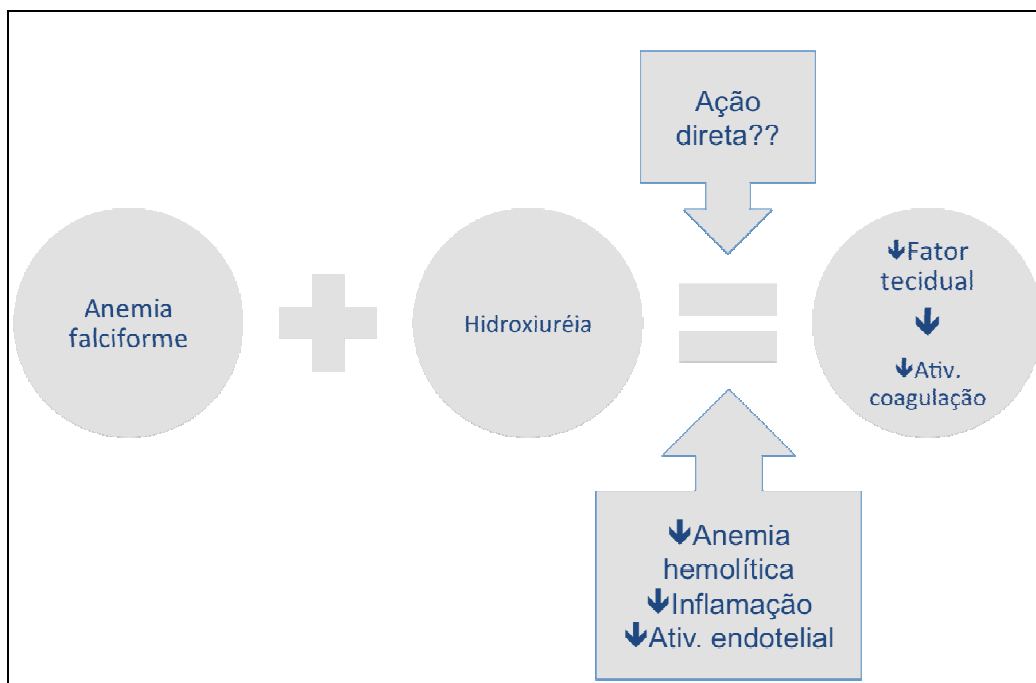


Figura 27 – Hipóteses sobre a ação da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme. O tratamento com hidroxiuréia em pacientes portadores de anemia falciforme está associado a uma redução na expressão do fator tecidual e consequente redução da ativação da coagulação. Este efeito da hidroxiuréia pode ser resultado de seu efeito em reduzir a anemia hemolítica, a inflamação e a ativação endotelial, todos fatores contribuintes para o estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme, ou pode ser resultado de um efeito direto da droga na inibição da expressão do fator tecidual.

Apesar das inúmeras evidências demonstrando que existe uma ativação da coagulação na AF, ainda não está claro qual será o benefício de se modular este estado de hipercoagulabilidade. Há muitos anos autores vêm fazendo tentativas com uso de anticoagulantes e principalmente de antiagregantes plaquetários nestes doentes (Zago et al. 1984). Esse interesse no uso de antiagregantes plaquetários ainda está presente em

estudos atuais (Wun et al. 2013). Porém, ao longo de todos estes anos ainda não ficou claro qual o benefício que estas drogas podem ter na AF. Aparentemente o que os estudos conseguiram demonstrar em comum é que há melhora nos episódios de crises álgicas. Ainda não há evidências de que o uso de antiagregantes ou anticoagulantes possa reduzir a ocorrência de complicações tromboembólicas ou outras complicações crônicas na AF.

Acreditamos que os resultados do presente estudo podem apoiar uma nova aplicação clínica para o uso de hidroxiuréia em pacientes com AF além de seu uso tradicional. Para verificar se este efeito biológico da hidroxiuréia pode resultar numa redução na incidência de complicações tromboembólicas na AF são necessários futuros estudos longitudinais, prospectivos, incluindo uma grande casuística de pacientes e com longo tempo de seguimento.

Em nosso estudo dos pacientes portadores de HbSC, os resultados indicam que estes pacientes apresentam elevação de marcadores de ativação da coagulação quando comparados aos controles, embora não tão intensa como visto na AF. Pacientes com HbSC apresentaram elevação da expressão do FT, e confirmando a relevância biológica desta expressão, apresentaram também níveis elevados de TAT e D-dímero em comparação com controles normais. A expressão do FT foi semelhante à encontrada na AF, porém os níveis de TAT e D-dímero foram inferiores aos vistos na AF, indicando que a ativação da coagulação na HbSC seja mais branda do que na AF. Nossos dados estão em concordância com um estudo recente em crianças com DF, onde foram incluídos 12 pacientes com HbSC, que apresentaram níveis de TAT e D-dímero inferiores aos pacientes com AF (Setty et al. 2012). Neste estudo também foram avaliados monócitos positivos

para FT e atividade pró-coagulante do FT, ambos sendo inferiores na HbSC do que na AF. Em contrapartida, em um segundo estudo recente em adultos com DF, onde foram incluídos 7 pacientes com HbSC, ao serem comparados com portadores de AF e hemoglobinopatia S β^0 , os níveis de TAT e D-dímero foram semelhantes entre os dois grupos, assim como a atividade pró-coagulante do FT associado a micropartículas (Ataga et al. 2012). De modo geral, os relatos na literatura descrevem níveis reduzidos destes marcadores de geração de trombina na HbSC em comparação com AF (Westerman et al. 1999; Setty et al. 2001; Mohan et al. 2005; Blann et al. 2008). Porém a HbSC não foi o foco de nenhum destes estudos, e os números de pacientes com HbSC incluídos era sempre baixo, o que leva a uma grande variabilidade de resultados. Um dado importante do nosso estudo é que realizamos comparações dos marcadores de hipercoagulabilidade entre os pacientes com HbSC e pacientes com AF com e sem uso de hidroxiuréia, permitindo avaliar as diferenças entre cada grupo.

Em nossa coorte de HbSC o grau de ativação endotelial, avaliada pelos níveis de trombosmodulina solúvel, foi intensa, em grau semelhante à encontrada na AF. Na literatura, há relatos de níveis semelhantes de sVCAM-1 entre os dois grupos de pacientes, porém menores níveis de P-selectina e E-selectina solúveis na HbSC. (Blann et al. 2008; Setty et al. 2012). Em relação à atividade inflamatória, encontramos níveis semelhantes de TNF- α nos dois grupos de pacientes, o que está em acordo com a literatura (Mohan et al. 2005; Setty et al. 2012). Os níveis de IL-8 foram semelhantes ao grupo de pacientes com AF sem uso da hidroxiuréia e inferiores ao encontrado no total de pacientes com AF. Desta forma, parece haver uma intensa atividade

inflamatória na HbSC, aparentemente tão intensa quanto a vista na AF. Mais importante, nossas análises de correlação sugerem que a inflamação, indicada pelas contagens de leucócitos e monócitos, é um importante fator contribuinte para a ativação hemostática na HbSC. Nossos resultados de correlação também indicaram que os pacientes com HbSC com maior atividade hemolítica apresentaram maior ativação da coagulação. De forma semelhante ao encontrado na AF, na HbSC, a hipercoagulabilidade encontrada parece estar relacionada a inflamação e hemólise. Sendo assim, acreditamos que a fisiopatologia da ativação da coagulação na HbSC é semelhante à vista na AF, porém podem haver mecanismos distintos que ainda precisam ser investigados. Futuros estudos são necessários para investigar se outros fatores singulares à HbSC, em especial a hiperviscosidade, têm um papel na fisiopatogênese da hipercoagulabilidade na HbSC.

A ativação da coagulação possivelmente está envolvida na fisiopatologia de complicações crônicas muito prevalentes na HbSC: retinopatia e osteonecrose. Além disso, em nossa casuística, os pacientes com autoesplenectomia apresentaram maiores níveis dos marcadores pró-coagulantes, possivelmente devido a uma maior taxa de hemólise intravascular e contagens elevadas de leucócitos e plaquetas. Tendo em vista a alta prevalência e a morbimortalidade das complicações trombóticas nesta população, acreditamos que futuros estudos deveriam se concentrar em uma melhor compreensão de hipercoagulabilidade na HbSC.

6. CONCLUSÕES

Parte 1 – Avaliação do efeito da hidroxiuréia no estado de hipercoagulabilidade da anemia falciforme:

- Pacientes com AF apresentam uma expressão aumentada do fator tecidual e o uso da hidroxiuréia está associado a uma redução significativa desta expressão.
- Confirmando a relevância biológica da expressão do fator tecidual, os marcadores finais de geração de trombina, TAT e F1+2, também estão elevados em pacientes com AF e o uso da hidroxiureia está associado a uma redução significativa do TAT.
- A ativação endotelial, evidenciada pelos níveis de trombosmodulina solúvel, também está aumentada na AF e o uso da hidroxiuréia está associado a uma redução dos níveis deste marcador.
- A inflamação, avaliada pelos níveis de TNF- α , também se encontra exacerbada na AF. O tratamento com hidroxiuréia está associado a uma redução significativa dos níveis de TNF- α .
- Existe uma correlação inversa entre os níveis de HbF e os marcadores da coagulação, ou seja, quanto maior a expressão de HbF menor a ativação da coagulação. Os marcadores da coagulação também apresentaram correlações significativas com a piora da hemólise, da ativação endotelial e da inflamação.
- A hidroxiuréia é capaz de induzir uma redução dos níveis de TAT em um modelo murino da AF incapaz de expressar HbF. Esta redução do TAT foi vista mesmo na ausência da melhora dos marcadores IL-6 e sVCAM-1.
- Sendo assim, concluímos que o uso da hidroxiuréia na AF está associada a redução da expressão do fator tecidual, com consequente redução da

ativação da coagulação, além de redução da inflamação e ativação endotelial. Em um modelo murino de AF, a hidroxiuréia reduz a ativação da coagulação, mesmo na ausência de melhora na hemólise, inflamação e ativação endotelial.

Parte 2 – Caracterização do estado de hipercoagulabilidade na hemoglobinopatia SC:

- Na HbSC existe uma ativação da coagulação, evidenciada pelos aumentos da expressão do fator tecidual e dos marcadores TAT e D-dímero, porém menos intensa do que a observada na AF.
- Na HbSC existe uma ativação endotelial, avaliada pelo marcador trombomodulina solúvel, em níveis semelhantes ao visto na AF.
- O marcador inflamatório TNF- α encontra-se aumentado na HbSC, em níveis semelhantes aos encontrados na AF. Os níveis de IL-8 na HbSC são semelhantes aos encontrados em controles normais, sendo inferiores aos vistos na AF.
- Na HbSC houve uma correlação positiva significativa entre os marcadores da coagulação e marcadores de hemólise e inflamação.
- Na HbSC os marcadores da coagulação estão associados às seguintes complicações clínicas: retinopatia, osteonecrose e auto-esplenectomia.
- Sendo assim, concluímos que portadores de HbSC apresentam aumento dos marcadores pró-coagulantes quando comparados a controles normais, porém em grau menos acentuado do que visto na AF, e apresentam um aumento da inflamação e ativação endotelial quando comparados a controles normais, em grau semelhante ao encontrado na

AF. Marcadores pró-coagulantes encontram-se aumentados em pacientes com retinopatia, osteonecrose e auto-esplenectomia, em comparação com pacientes sem estas complicações clínicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, C. B., C. Scheiermann, J. E. Jang, C. Prophete, F. F. Costa, N. Conran, et al. "Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice." Blood 2012.

Ataga, K. I., J. E. Brittain, P. Desai, R. May, S. Jones, J. Delaney, et al. "Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease." PLoS One 2012 **7**(1): e29786.

Ataga, K. I., M. D. Cappellini and E. A. Rachmilewitz "Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability." Br J Haematol 2007 **139**(1): 3-13.

Ataga, K. I. and N. S. Key "Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007 **2007**: 91-6.

Ataga, K. I., C. G. Moore, C. A. Hillery, S. Jones, H. C. Whinna, D. Strayhorn, et al. "Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension." Haematologica 2008 **93**(1): 20-6.

Ataga, K. I., C. G. Moore, S. Jones, O. Olajide, D. Strayhorn, A. Hinderliter, et al. "Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study." Br J Haematol 2006 **134**(1): 109-15.

Austin, H., N. S. Key, J. M. Benson, C. Lally, N. F. Dowling, C. Whitsett, et al. "Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks." Blood 2007 **110**(3): 908-12.

Bartolucci, P., C. Brugnara, A. Teixeira-Pinto, S. Pissard, K. Moradkhani, H. Jouault, et al. "Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis." Blood 2012 **120**(15): 3136-41.

Belcher, J. D., P. H. Marker, J. P. Weber, R. P. Hebbel and G. M. Vercellotti "Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion." Blood 2000 **96**(7): 2451-9.

Benkerrou, M., C. Delarche, L. Brahimi, M. Fay, E. Vilmer, J. Elion, et al. "Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia." Blood 2002 **99**(7): 2297-303.

Bernaudin, F., S. Verlhac, L. Coic, E. Lesprit, P. Brugieres and P. Reinert "Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler." Pediatr Radiol 2005 **35**(3): 242-8.

Bhatia, M. and M. C. Walters "Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future." Bone Marrow Transplant 2008 **41**(2): 109-17.

Blann, A. D., J. S. Mohan, D. Bareford and G. Y. Lip "Soluble P-selectin and vascular endothelial growth factor in steady state sickle cell disease: relationship to genotype." J Thromb Thrombolysis 2008 **25**(2): 185-9.

Brand, K., B. J. Fowler, T. S. Edgington and N. Mackman "Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide." Mol Cell Biol 1991 **11**(9): 4732-8.

Brawley, O. W., L. J. Cornelius, L. R. Edwards, V. N. Gamble, B. L. Green, C. Inturrisi, et al. "National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease." Ann Intern Med 2008 **148**(12): 932-8.

Bridges, K. R., G. D. Barabino, C. Brugnara, M. R. Cho, G. W. Christoph, G. Dover, et al. "A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy." Blood 1996 **88**(12): 4701-10.

Cabannes, R., J. Lonsdorfer, J. P. Castaigne, A. Ondo, A. Plassard and I. Zohoun "Clinical and biological double-blind-study of ticlopidine in preventive treatment of sickle-cell disease crises." Agents Actions Suppl 1984 **15**: 199-212.

Canalli, A. A., C. F. Franco-Penteado, S. T. Saad, N. Conran and F. F. Costa "Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation." Haematologica 2008 **93**(4): 605-9.

Cappellini, M. D. "Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007 **2007**: 74-8.

Chantrathammachart, P., N. Mackman, E. Sparkenbaugh, J. G. Wang, L. V. Parise, D. Kirchhofer, et al. "Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease." Blood 2012 **120**(3): 636-46.

Chantrathammachart, P., N. Mackman, E. Sparkenbaugh, J. G. Wang, L. V. Parise, D. Kirchhofer, et al. "Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease." Blood 2012.

Chaplin, H., Jr., M. C. Monroe, A. C. Malecek, L. K. Morgan, J. Michael and W. A. Murphy "Preliminary trial of minidose heparin prophylaxis for painful sickle cell crises." East Afr Med J 1989 **66**(9): 574-84.

Charache, S., M. L. Terrin, R. D. Moore, G. J. Dover, F. B. Barton, S. V. Eckert, et al. "Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia." N Engl J Med 1995 **332**(20): 1317-22.

Chen, J., W. E. Hobbs, J. Le, P. J. Lenting, P. G. de Groot and J. A. Lopez "The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma." Blood 2011 **117**(13): 3680-3.

Cokic, V. P., S. A. Andric, S. S. Stojilkovic, C. T. Noguchi and A. N. Schechter "Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells." Blood 2008 **111**(3): 1117-23.

Cokic, V. P., R. D. Smith, B. B. Beleslin-Cokic, J. M. Njoroge, J. L. Miller, M. T. Gladwin, et al. "Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase." J Clin Invest 2003 **111**(2): 231-9.

Conran, N., C. B. Almeida, C. Lanaro, R. P. Ferreira, F. Traina, S. T. Saad, et al. "Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients." Br J Haematol 2007 **139**(1): 148-58.

Conran, N. and F. F. Costa "Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions." Clin Biochem 2009 **42**(18): 1824-38.

Conran, N., A. Fattori, S. T. Saad and F. F. Costa "Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea." Am J Hematol 2004 **76**(4): 343-7.

Conran, N., S. T. Saad, F. F. Costa and T. Ikuta "Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease." Ann Hematol 2007 **86**(4): 255-61.

Covas, D. T., I. de Lucena Angulo, P. Vianna Bonini Palma and M. A. Zago "Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia." Haematologica 2004 **89**(3): 273-80.

DeBaun, M. R., S. A. Sarnaik, M. J. Rodeghier, C. P. Minniti, T. H. Howard, R. V. Iyer, et al. "Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, sex, and relative high systolic blood pressure." Blood 2012 **119**(16): 3684-90.

Earley, C. J., S. J. Kittner, B. R. Feeser, J. Gardner, A. Epstein, M. A. Wozniak, et al. "Stroke in children and sickle-cell disease: Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study." Neurology 1998 **51**(1): 169-76.

Egorina, E. M., M. A. Sovershaev, G. Bjorkoy, F. X. Gruber, J. O. Olsen, B. Parhami-Seren, et al. "Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005 **25**(7): 1493-8.

Egorina, E. M., M. A. Sovershaev, J. O. Olsen and B. Osterud "Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer." Blood 2008 **111**(3): 1208-16.

Esmon, C. T. "Crosstalk between inflammation and thrombosis." Maturitas 2004 **47**(4): 305-14.

Fathallah, H. and G. F. Atweh "Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006: 58-62.

Fullerton, H. J., Y. W. Wu, S. Zhao and S. C. Johnston "Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities." Neurology 2003 **61**(2): 189-94.

Furie, B. and B. C. Furie "Mechanisms of thrombus formation." N Engl J Med 2008 **359**(9): 938-49.

Gambero, S., A. A. Canalli, F. Traina, D. M. Albuquerque, S. T. Saad, F. F. Costa, et al. "Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties." Eur J Haematol 2007 **78**(2): 144-51.

Gladwin, M. T. and G. J. Kato "Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens!" Haematologica 2008 **93**(1): 1-3.

Gladwin, M. T., J. H. Shelhamer, F. P. Ognibene, M. E. Pease-Fye, J. S. Nichols, B. Link, et al. "Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease." Br J Haematol 2002 **116**(2): 436-44.

Hannemann, A., E. Weiss, D. C. Rees, S. Dalibalta, J. C. Ellory and J. S. Gibson "The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype)." Anemia 2011 **2011**: 248527.

Haupt, H. M., G. W. Moore, T. W. Bauer and G. M. Hutchins "The lung in sickle cell disease." Chest 1982 **81**(3): 332-7.

Hebbel, R. P., R. Osarogiagbon and D. Kaul "The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy." Microcirculation 2004 **11**(2): 129-51.

Helley, D., R. Girot, M. C. Guillin and A. Bezeaud "Sickle cell disease: relation between procoagulant activity of red blood cells from different phenotypes and in vivo blood coagulation activation." Br J Haematol 1997 **99**(2): 268-72.

Hoffman, M. "Remodeling the blood coagulation cascade." J Thromb Thrombolysis 2003 **16**(1-2): 17-20.

Ikuta, T., S. Ausenda and M. D. Cappellini "Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 2001 **98**(4): 1847-52.

Ingram, V. M. "Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting." Biochim Biophys Acta 1958 **28**(3): 539-45.

James, A. H., M. G. Jamison, L. R. Brancazio and E. R. Myers "Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality." Am J Obstet Gynecol 2006 **194**(5): 1311-5.

Johnson, F. L., A. T. Look, J. Gockerman, M. R. Ruggiero, L. Dalla-Pozza and F. T. Billings, 3rd "Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia." N Engl J Med 1984 **311**(12): 780-3.

Kato, G. J., S. Martyr, W. C. Blackwelder, J. S. Nichols, W. A. Coles, L. A. Hunter, et al. "Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality." Br J Haematol 2005 **130**(6): 943-53.

Kato, G. J., V. McGowan, R. F. Machado, J. A. Little, J. t. Taylor, C. R. Morris, et al. "Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease." Blood 2006 **107**(6): 2279-85.

Kaul, D. K., R. Kollander, H. Mahaseth, X. D. Liu, A. Solovey, J. Belcher, et al. "Robust vascular protective effect of hydroxamic acid derivatives in a sickle mouse model of inflammation." Microcirculation 2006 **13**(6): 489-97.

Key, N. S., A. Slungaard, L. Dandeleit, S. C. Nelson, C. Moertel, L. A. Styles, et al. "Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease." Blood 1998 **91**(11): 4216-23.

Koduri, P. R., B. Agbemadzo and S. Nathan "Hemoglobin S-C disease revisited: clinical study of 106 adults." Am J Hematol 2001 **68**(4): 298-300.

Kollander, R., A. Solovey, L. C. Milbauer, F. Abdulla, R. J. Kelm, Jr. and R. P. Hebbel "Nuclear factor-kappa B (NFkappaB) component p50 in blood mononuclear cells regulates endothelial tissue factor expression in sickle transgenic mice: implications for the coagulopathy of sickle cell disease." Transl Res 2010 **155**(4): 170-7.

Kurantsin-Mills, J., F. A. Ofori, T. K. Safa, R. S. Siegel and L. S. Lessin "Plasma factor VII and thrombin-antithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients." Br J Haematol 1992 **81**(4): 539-44.

Kwiatkowski, J. L., R. A. Zimmerman, A. N. Pollock, W. Seto, K. Smith-Whitley, J. Shults, et al. "Silent infarcts in young children with sickle cell disease." Br J Haematol 2009 **146**(3): 300-5.

Lanaro, C., C. F. Franco-Penteado, D. M. Albuquerque, S. T. Saad, N. Conran and F. F. Costa "Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy." J Leukoc Biol 2009 **85**(2): 235-42.

Lebensburger, J. D., T. I. Pestina, R. E. Ware, K. L. Boyd and D. A. Persons "Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model." Haematologica 2010 **95**(9): 1599-603.

Lionnet, F., N. Hammoudi, K. S. Stojanovic, V. Avellino, G. Grateau, R. Girot, et al. "Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases." Haematologica 2012 **97**(8): 1136-41.

Mackman, N. "The many faces of tissue factor." J Thromb Haemost 2009 **7 Suppl 1**: 136-9.

Manci, E. A., D. E. Culbertson, Y. M. Yang, T. M. Gardner, R. Powell, J. Haynes, Jr., et al. "Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study." Br J Haematol 2003 **123**(2): 359-65.

Maugeri, N., G. Giordano, M. P. Petrilli, V. Fraticelli, G. de Gaetano, C. Cerletti, et al. "Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug?" J Thromb Haemost 2006 **4**(12): 2593-8.

Mohan, J. S., G. Y. Lip, J. Wright, D. Bareford and A. D. Blann "Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation." Blood Coagul Fibrinolysis 2005 **16**(3): 209-14.

Morris, C. R. "Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2008 **2008**: 177-85.

Nagel, R. L., M. E. Fabry and M. H. Steinberg "The paradox of hemoglobin SC disease." Blood Rev 2003 **17**(3): 167-78.

Nebor, D., M. Romana, R. Santiago, N. Vachier, J. Picot, C. Broquere, et al. "Fetal hemoglobin and hydroxycarbamide modulate both plasma concentration and cellular origin of circulating microparticles in sickle cell anemia children." Haematologica 2013 **98**(6): 862-7.

Novelli, E. M., C. Huynh, M. T. Gladwin, C. G. Moore and M. V. Ragni "Pulmonary embolism in sickle cell disease: a case-control study." J Thromb Haemost 2012 **10**(5): 760-6.

Odievre, M. H., V. Bony, M. Benkerrou, C. Lapoumeroulie, C. Alberti, R. Ducrocq, et al. "Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease." Haematologica 2008 **93**(4): 502-10.

Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, L. A. Sleeper, S. T. Miller, S. Embury, J. W. Moohr, et al. "Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors." Blood 1998 **91**(1): 288-94.

Oppenheimer, E. H. and J. R. Esterly "Pulmonary changes in sickle cell disease." Am Rev Respir Dis 1971 **103**(6): 858-9.

Osterud, B. "Tissue factor expression in blood cells." Thromb Res 2010 **125 Suppl 1**: S31-4.

Osterud, B., L. V. Rao and J. O. Olsen "Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes." Thromb Haemost 2000 **83**(6): 861-7.

Paszty, C., C. M. Brion, E. Mancini, H. E. Witkowska, M. E. Stevens, N. Mohandas, et al. "Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease." Science 1997 **278**(5339): 876-8.

Persons, D. A. "Hematopoietic stem cell gene transfer for the treatment of hemoglobin disorders." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009: 690-7.

Platt, O. S. "Sickle cell anemia as an inflammatory disease." J Clin Invest 2000 **106**(3): 337-8.

Platt, O. S. "Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia." N Engl J Med 2008 **358**(13): 1362-9.

Platt, O. S., S. H. Orkin, G. Dover, G. P. Beardsley, B. Miller and D. G. Nathan "Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia." J Clin Invest 1984 **74**(2): 652-6.

Powars, D., L. S. Chan and W. A. Schroeder "The variable expression of sickle cell disease is genetically determined." Semin Hematol 1990 **27**(4): 360-76.

Powars, D. R., A. Hiti, E. Ramicone, C. Johnson and L. Chan "Outcome in hemoglobin SC disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors." Am J Hematol 2002 **70**(3): 206-15.

Proenca-Ferreira, R., C. F. Franco-Penteado, F. Traina, S. T. Saad, F. F. Costa and N. Conran "Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for α IIb β 3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity." Br J Haematol 2010 **149**(2): 280-8.

Qari, M. H., U. Dier and S. A. Mousa "Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease." Clin Appl Thromb Hemost 2012 **18**(2): 195-200.

Rees, D. C. "The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease." Haematologica 2011 **96**(4): 488-91.

Saleh, A. W., H. F. Hillen and A. J. Duits "Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy." Acta Haematol 1999 **102**(1): 31-7.

Setty, B. N., S. G. Betal, J. Zhang and M. J. Stuart "Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia." J Thromb Haemost 2008 **6**(12): 2202-9.

Setty, B. N., N. S. Key, A. K. Rao, S. Gayen-Betal, S. Krishnan, C. D. Dampier, et al. "Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis." Br J Haematol 2012.

Setty, B. N., S. Kulkarni, A. K. Rao and M. J. Stuart "Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation." Blood 2000 **96**(3): 1119-24.

Setty, B. N., A. K. Rao and M. J. Stuart "Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection." Blood 2001 **98**(12): 3228-33.

Shet, A. S., O. Aras, K. Gupta, M. J. Hass, D. J. Rausch, N. Saba, et al. "Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes." Blood 2003 **102**(7): 2678-83.

Solovey, A., L. Gui, N. S. Key and R. P. Hebbel "Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia." J Clin Invest 1998 **101**(9): 1899-904.

Solovey, A., R. Kollander, L. C. Milbauer, F. Abdulla, Y. Chen, R. J. Kelm, Jr., et al. "Endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide regulate endothelial tissue factor expression in vivo in the sickle transgenic mouse." Am J Hematol 2010 **85**(1): 41-5.

Solovey, A., R. Kollander, A. Shet, L. C. Milbauer, S. Choong, A. Panoskaltsis-Mortari, et al. "Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin." Blood 2004 **104**(3): 840-6.

Solovey, A., Y. Lin, P. Browne, S. Choong, E. Wayner and R. P. Hebbel "Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia." N Engl J Med 1997 **337**(22): 1584-90.

Solovey, A. A., A. N. Solovey, J. Harkness and R. P. Hebbel "Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study." Blood 2001 **97**(7): 1937-41.

Sparkenbaugh, E. and R. Pawlinski "Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease." Br J Haematol 2013 **162**(1): 3-14.

Stein, P. D., A. Beemath, F. A. Meyers, E. Skaf and R. E. Olson "Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease." Am J Med 2006 **119**(10): 897 e7-11.

Steinberg, M. H., F. Barton, O. Castro, C. H. Pegelow, S. K. Ballas, A. Kutlar, et al. "Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment." JAMA 2003 **289**(13): 1645-51.

Styles, L. A., B. Lubin, E. Vichinsky, S. Lawrence, M. Hua, S. Test, et al. "Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea." Blood 1997 **89**(7): 2554-9.

Tomer, A., L. A. Harker, S. Kasey and J. R. Eckman "Thrombogenesis in sickle cell disease." J Lab Clin Med 2001 **137**(6): 398-407.

van Beers, E. J., M. C. Schaap, R. J. Berckmans, R. Nieuwland, A. Sturk, F. F. van Doormaal, et al. "Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease." Haematologica 2009 **94**(11): 1513-9.

van Langevelde, K., L. E. Flinterman, A. van Hylckama Vlieg, F. R. Rosendaal and S. C. Cannegieter "Broadening the factor V Leiden paradox: pulmonary embolism and deep-vein thrombosis as 2 sides of the spectrum." Blood 2012 **120**(5): 933-46.

van Stralen, K. J., C. J. Doggen, I. D. Bezemer, E. R. Pomp, T. Lisman and F. R. Rosendaal "Mechanisms of the factor V Leiden paradox." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008 **28**(10): 1872-7.

Vermeylen, C. "Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease." Blood Rev 2003 **17**(3): 163-6.

Vichinsky, E. P., L. D. Neumayr, A. N. Earles, R. Williams, E. T. Lennette, D. Dean, et al. "Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group." N Engl J Med 2000 **342**(25): 1855-65.

Villagra, J., S. Shiva, L. A. Hunter, R. F. Machado, M. T. Gladwin and G. J. Kato "Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin." Blood 2007 **110**(6): 2166-72.

Ware, R. E. and R. W. Helms "Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWiTCH)." Blood 2012 **119**(17): 3925-32.

Ware, R. E., S. A. Zimmerman and W. H. Schultz "Hydroxyurea as an alternative to blood transfusions for the prevention of recurrent stroke in children with sickle cell disease." Blood 1999 **94**(9): 3022-6.

Ware, R. E., S. A. Zimmerman, P. B. Sylvestre, N. A. Mortier, J. S. Davis, W. R. Treem, et al. "Prevention of secondary stroke and resolution of transfusional iron overload in children with sickle cell anemia using hydroxyurea and phlebotomy." J Pediatr 2004 **145**(3): 346-52.

Weatherall, D. J. "The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden." Blood 2010 **115**(22): 4331-6.

Westerman, M., A. Pizzey, J. Hirschman, M. Cerino, Y. Weil-Weiner, P. Ramotar, et al. "Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy." Br J Haematol 2008 **142**(1): 126-35.

Westerman, M. P., D. Green, A. Gilman-Sachs, K. Beaman, S. Freels, L. Boggio, et al. "Coagulation changes in individuals with sickle cell trait." Am J Hematol 2002 **69**(2): 89-94.

Westerman, M. P., D. Green, A. Gilman-Sachs, K. Beaman, S. Freels, L. Boggio, et al. "Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease." J Lab Clin Med 1999 **134**(4): 352-62.

Wun, T., D. Soulieres, A. L. Frelinger, L. Krishnamurti, E. M. Novelli, A. Kutlar, et al. "A double-blind, randomized, multicenter phase 2 study of prasugrel versus placebo in adult patients with sickle cell disease." J Hematol Oncol 2013 **6**: 17.

Zago, M. A., F. F. Costa, S. J. Ismael, L. G. Tone and C. Bottura "Treatment of sickle cell diseases with aspirin." Acta Haematol 1984 **72**(1): 61-4.

Zimmerman, S. A., W. H. Schultz, S. Burgett, N. A. Mortier and R. E. Ware "Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia." Blood 2007 **110**(3): 1043-7.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 22/09/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 792/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0622.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITO DA HIDROXIURÉIA NO ESTADO DE HIPERCOAGULABILIDADE DA DOENÇA FALCIFORME”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marina Santana Pereira

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/09/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/09/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar o efeito que a hidroxiuréia tem-nos diversos componentes do balanço hemostático da doença falciforme, explorando sua ação em três dos principais componentes: (i) expressão do fator tecidual; (ii) geração final de trombina e (iii) ativação endotelial.

III - SUMÁRIO

A amostra será constituída de três grupos, um deles controle. O primeiro grupo se constitui por portadores da DF e se divide em: (a) aqueles em uso de hidroxiuréia e (b) aqueles sem seu uso. O grupo controle se constitui de indivíduos saudáveis, doadores de sangue no Hemocentro. Os critérios de inclusão terão por base o diagnóstico confirmado de DF, o seguimento do paciente no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp e a ausência de internação hospitalar, crise vaso-oclusiva ou transfusão sanguínea nos últimos três meses anteriores à coleta da amostra. Os critérios de exclusão terão por base a ocorrência de crise vaso-oclusiva, internação hospital ou transfusão sanguínea nos últimos três meses anteriores à coleta da amostra. Os sujeitos saudáveis do grupo controle serão recrutados quando forem fazer doação de sangue e a amostra necessária será recolhida naquela ocasião. A metodologia assim como as condições de desenvolvimento do projeto parecem adequadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A estrutura do protocolo está adequada. Todos os itens solicitados são apresentados e justificados, incluindo orçamento. Os TCLEs são claros e de fácil compreensão e há termos distintos para os portadores de DF e os sujeitos sadios. Apenas a título de sugestão, talvez fosse adequado modificar o início do segundo parágrafo sob "Objetivo da Pesquisa" no TCLE do grupo controle. Parece estranho afirmar: "Mesmo você não tendo a doença, /.../" Não seria o caso de começar por: Estamos pedindo a sua colaboração /.../ porque você é um doador sadio e por isso precisamos usar os seus resultados para comparação com o grupo de pacientes com a finalidade de ...

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

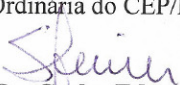
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

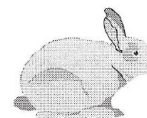
Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de setembro de 2009.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito da hidroxiuréia em marcadores de hipercoagulabilidade em modelo experimental murino transgênico falciforme" (protocolo nº 2787-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fabiola Traina / Marina Pereira Colella, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de agosto de 2012.

Campinas, 27 de agosto de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

9. APÊNDICES



HEMOCENTRO – UNICAMP



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Pacientes)**

Título da pesquisa: “Estudo do papel da hidroxiureia no estado de hipercoagulabilidade da doença falciforme”

Pesquisadora responsável: Dra. Marina Pereira Colella

Orientadora: Dra. Fabíola Traína

Objetivo da pesquisa: Entender melhor a ação da hidroxiuréia (hydrea) nos pacientes com doença falciforme. Sabemos que na doença falciforme ocorrem várias alterações no sistema de coagulação do sangue. Isso causa várias consequências para o paciente, por exemplo, aumenta o risco de ter uma trombose ou um AVC (derrame cerebral). Iremos estudar se a hidroxiuréia consegue melhorar estas alterações da coagulação na doença falciforme e diminuir estes riscos.

Sendo um paciente portador de doença falciforme, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. A sua participação não é obrigatória e caso você não queira participar isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para que a pesquisadora possa ver a sua pasta médica e será necessário coletar 24 ml de sangue (12 colheres de sopa). Essa coleta será feita pela enfermagem do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames de rotina e não será necessária outra punção (serão coletados todos os tubos numa só picada). Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de sangue para exames: a dor da picada da agulha e às vezes um hematoma (mancha roxa) no local da picada.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o sangue coletado será descartado (jogado fora) após os exames. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e quando o trabalho for publicado o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor a doença falciforme e a ação da hidroxiuréia.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Dra Marina (3343-8382), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do Hemocentro. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, fone 019 -3521 – 8936, fax 019- 3521-7187, e-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

HC: _____

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador



HEMOCENTRO – UNICAMP



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Controles Sadios)**

Título da pesquisa: “Estudo do papel da hidroxiureia no estado de hipercoagulabilidade da doença falciforme”

Pesquisadora responsável: Dra. Marina Santana Pereira

Orientadora: Dra. Fabíola Traína

Objetivo da pesquisa: Entender melhor a ação da hidroxiuréia nos pacientes com doença falciforme. Sabemos que na doença falciforme ocorrem várias alterações no sistema de coagulação do sangue. Isso causa várias consequências para o paciente, por exemplo, aumenta o risco de ter uma trombose ou um AVC (derrame cerebral). Iremos estudar se a hidroxiuréia consegue melhorar estas alterações da coagulação na doença falciforme e diminuir estes riscos.

Mesmo você não tendo a doença, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. Usaremos os seus resultados como grupo controle sadio, para comparação com o grupo de pacientes. A sua participação não é obrigatória e caso você não queira participar isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para coletar 24 ml de sangue (12 colheres de sopa). Essa coleta será feita pela enfermagem do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames de necessários para a doação de sangue e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de sangue para exames: a dor da picada da agulha e às vezes um hematoma (mancha roxa) no local da picada.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o sangue coletado será descartado (jogado fora) após os exames. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e quando o trabalho for publicado o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor a doença falciforme e a ação da hidroxiuréia.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Dra Marina (3343-8382), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do

Hemocentro. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, fone 019 -3521 – 8936, fax 019- 3521-7187, e-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador

Apêndice 2 – Artigo publicado

Letters to the Editor 1967

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- 1 Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7(Suppl 1): 136–9.
- 2 Mackman N. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2273–81.
- 3 Gregory SA, Morrissey JH, Edgington TS. Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2752–5.
- 4 Osterud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 2010; 125(Suppl 1): S31–4.
- 5 Osterud B, Flaegstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost* 1983; 49: 5–7.
- 6 Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocyte cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 1991; 174: 1517–26.
- 7 Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J* 1995; 9: 883–9.
- 8 Hall AJ, Vos HL, Bertina RM. Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation. *J Biol Chem* 1999; 274: 376–83.
- 9 Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocyte cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98: 1429–39.
- 10 van den Eijnden MM, Steenhauer SI, Reitsma PH, Bertina RM. Tissue factor expression during monocyte-macrophage differentiation. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1129–36.
- 11 Ahamed J, Niessen F, Kurokawa T, Lee YK, Bhattacharjee G, Morrissey JH, Ruf W. Regulation of macrophage procoagulant responses by the tissue factor cytoplasmic domain in endotoxemia. *Blood* 2007; 109: 5251–9.
- 12 Pawlinski R, Wang JG, Owens AP 3rd, Williams J, Antoniak S, Tencati M, Luther T, Rowley JW, Low EN, Weyrich AS, Mackman N. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 2010; 116: 806–14.
- 13 Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106: 1604–11.
- 14 Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP, Mackman N. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner. *Blood* 2011; 118: 2366–74.
- 15 Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011; 108: 1284–97.
- 16 Owens AP 3rd, Passam FH, Antoniak S, Marshall SM, McDaniel AL, Rudel L, Williams JC, Hubbard BK, Dutton JA, Wang J, Tobias PS, Curtiss LK, Daugherty A, Kirchhofer D, Luyendyk JP, Moriarty PM, Nagarajan S, Furie BC, Furie B, Johns DG, et al. Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *J Clin Invest* 2012; 122: 558–68.
- 17 Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2932–44.
- 18 Wang JG, Manly D, Kirchhofer D, Pawlinski R, Mackman N. Levels of microparticle tissue factor activity correlate with coagulation activation in endotoxemic mice. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1092–8.
- 19 Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Heibel RP, Escobar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; 103: 4545–53.
- 20 Baroni M, Pizzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavara S, Caruso P, Bernardi F, Di Virgilio F. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 2007; 21: 1926–33.
- 21 Rao LV, Kothari H, Pendurthi UR. Tissue factor encryption and decryption: facts and controversies. *Thromb Res* 2012; 129(Suppl 2): S13–7.
- 22 Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 2001; 276: 125–32.

Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia

M. P. COLELLA, E. V. DE PAULA, N. CONRAN, J. A. MACHADO-NETO, J. M. ANNICCHINO-BIZZACCHI, F. F. COSTA, S. T. O. SAAD and F. TRAINA

Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas/Hemocentro UNICAMP, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil

To cite this article: Colella MP, de Paula EV, Conran N, Machado-Neto JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF, Saad STO, Traina F. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost* 2012;10: 1967–70.

Correspondence: Fabiola Traina, Hemocentro Unicamp, R. Carlos Chagas 480, CEP 13083-878, Campinas, SP, Brazil. Tel.: + 55 19 3521 8665; fax: + 55 19 3289 1089. E-mail: fabiolat@unicamp.br

DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04861.x

Received 6 July 2012, accepted 11 July 2012

© 2012 International Society on Thrombosis and Haemostasis

Several lines of evidence indicate that sickle cell anemia (SCA) is a state of increased hemostatic activation [1–4]. SCA patients present an elevated rate of thrombotic complications, including pulmonary embolism, stroke, and pregnancy-related venous thromboembolism [5]. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) is currently one of the main pillars of SCA management,

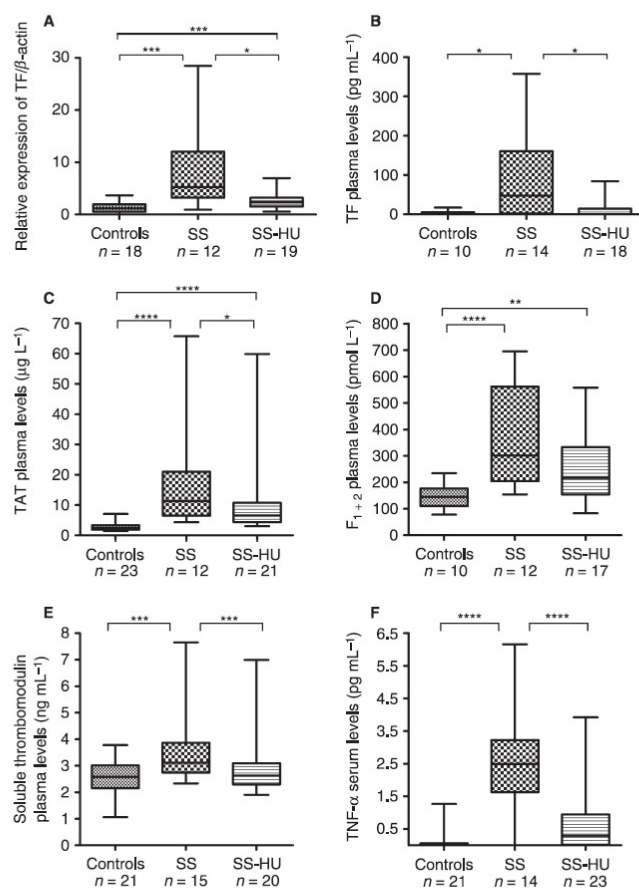


Fig. 1. Hydroxyurea therapy is associated with reduced levels of tissue factor (TF) expression, thrombin-antithrombin (TAT), prothrombin fragment F₁₊₂, soluble thrombomodulin, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). TF mRNA relative expression (A), plasma levels of TF (B), TAT (C), F₁₊₂ (D), and soluble thrombomodulin (E), and serum levels of TNF- α (F), were all measured in controls and sickle cell anemia (SCA) patients not using hydroxyurea (SS) and using hydroxyurea (SS-HU). The number of patients studied is indicated in each panel. *P*-values resulting from the comparison of two groups (indicated with bars) are shown: **P* $\leq$ 0.05, ***P* $\leq$ 0.01, ****P* $\leq$ 0.001, *****P* $<$ 0.0001.

improving both clinical complications and mortality in SCA [6], and has several well-defined beneficial effects that could contribute to inhibition of the hypercoagulability state in SCA. These include a reduction in phosphatidylserine exposure by erythrocytes, a reduction in the adhesive properties of erythrocytes and leukocytes, endothelial activation, nitric oxide depletion, platelet activation, and adhesive properties [7–9].

We hypothesized that hydroxyurea could modulate the hypercoagulable state observed in this condition, and evaluated its effects on the activation of coagulation in a cohort of SCA patients by measurements of tissue factor (TF) expression and final markers of thrombin generation. This was a cross-

sectional study that included steady-state SCA patients with no history of painful crisis, hospitalizations or blood transfusions in the preceding 3 months. We also selected 25 healthy age-matched controls. The university's ethics committee approved the study, and all patients signed an informed consent form.

Patients were subdivided into two groups according to the use (SS-HU group, *n* = 23) or not (SS group, *n* = 15) of hydroxyurea. The median duration of hydroxyurea therapy was 28 months (range: 3–196 months), and the median dose was 20 mg kg⁻¹ d⁻¹ (range: 11–34 mg kg⁻¹ d⁻¹). Patients using hydroxyurea clearly had a history of a more severe clinical phenotype than those not using it, as indicated by a

higher frequency of clinical sickling complications recorded before the initiation of therapy. Hydroxyurea resulted in significant improvements in the laboratory and clinical parameters of the SCA phenotype in treated patients (see Table S1 for detailed clinical information).

TF expression was analyzed by real-time quantitative PCR on total leukocyte mRNA. ELISA kits were used to measure plasma levels of *TF*, soluble thrombomodulin (American Diagnostica, Stamford, CT, USA), thrombin-antithrombin (TAT) complex, and prothrombin fragment $F_1 + 2$ ($F_1 + 2$) (Siemens, Marburg, Germany), and serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). *TF* mRNA expression and TAT, $F_1 + 2$, soluble thrombomodulin and TNF- α levels were compared between patient subgroups by use of the Mann-Whitney *U*-test. Fisher's exact test was used to compare categorical variables and to compare plasma *TF* levels. Spearman's rank correlation coefficient was used to analyze bivariate associations between the various markers. Statistical analyses were performed with PRISM 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Quantitative PCR analysis showed upregulation of *TF* mRNA expression in SS patients in comparison with healthy controls (5.0 [SS] vs. 1.16 [controls], $P = 0.0004$). Hydroxyurea therapy was associated with an important reduction in this expression (2.6 [SS-HU] vs. 5.0 [SS], $P = 0.02$) (Fig. 1A). The decrease in *TF* expression in patients using hydroxyurea was confirmed by measurements of detectable protein plasma levels. *TF* could be detected in the plasma of 79% (11/14) of patients not using hydroxyurea, as compared with only 28% (5/18) of the patients using the agent ($P = 0.01$) (Fig. 1B). The functional consequences of variations in *TF* expression were supported by measurements of indirect markers of thrombin generation. Levels of TAT and $F_1 + 2$ were significantly higher in SS patients than in controls (TAT, $11.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [SS] vs. $2.4 \mu\text{g L}^{-1}$ [controls], $P < 0.0001$; $F_1 + 2$, $301.5 \text{ pmol L}^{-1}$ [SS] vs. 145 pmol L^{-1} [controls], $P < 0.0001$). Treatment with hydroxyurea was accompanied by a significant reduction in TAT levels ($11.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [SS] vs. $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [SS-HU], $P = 0.03$) and a reduction in $F_1 + 2$ levels ($301.5 \text{ pmol L}^{-1}$ [SS] vs. 245 pmol L^{-1} [SS-HU], $P = 0.09$) (Fig. 1C–D).

The main finding of our study was that hydroxyurea therapy in SCA patients was associated with significant downregulation of *TF* expression and decreased levels of markers of thrombin generation (TAT and $F_1 + 2$). These results provide biological evidence for the association between hydroxyurea therapy and inhibition of coagulation activation in SCA. *TF* is the main physiologic initiator of coagulation *in vivo*, and a recent study showed that, in SCA mice, activation of coagulation was dependent on *TF* activity [10].

We also evaluated the effects of hydroxyurea on endothelial activation (soluble thrombomodulin) and inflammation (TNF- α). Significant elevations of soluble thrombomodulin plasma levels (3.6 ng mL^{-1} [SS] vs. 2.6 ng mL^{-1} [controls], $P = 0.0007$) and TNF- α serum

levels (2.7 pg mL^{-1} [SS] vs. 0 pg mL^{-1} [controls], $P < 0.0001$) were observed in SS patients in comparison with controls. Hydroxyurea was associated with important decreases in the levels of both markers (soluble thrombomodulin, 3.6 ng mL^{-1} [SS] vs. 2.5 ng mL^{-1} [SS-HU], $P = 0.0007$; TNF- α , 2.7 pg mL^{-1} [SS] vs. 0.3 pg mL^{-1} [SS-HU], $P < 0.0001$) (Fig. 1E–F).

Next, we analyzed the associations between hypercoagulability markers (*TF* mRNA expression, and TAT and $F_1 + 2$ levels) and other relevant laboratory parameters. *TF* mRNA levels showed significant correlations with fetal hemoglobin levels, hemoglobin/hematocrit, soluble thrombomodulin levels, TNF- α levels, and absolute neutrophil counts (all $P \leq 0.05$). TAT and $F_1 + 2$ levels showed significant correlations with fetal hemoglobin, hemoglobin and lactate dehydrogenase (LDH) levels (all $P \leq 0.05$) (Table S2). These results are in agreement with results from a recent study in children with sickle cell disease that also showed a significant association of *TF* expression and activity with hemolytic markers (reticulocyte counts and LDH levels), and it was suggested that this could support a role for early use of agents, such as hydroxyurea, to reduce the hemolytic activity in this disease [11]. Overall, our findings demonstrate that downregulation of hypercoagulability markers is associated with higher levels of fetal hemoglobin, and decreases in the levels of markers of hemolysis, endothelial activation, and inflammation, which are pathways that are closely connected to each other and to the activation of coagulation. Hydroxyurea is a drug that is capable of modulating all of these pathways, and it is possible that all of these mechanisms contribute to the potential inhibitory effect of hydroxyurea on the activation of coagulation.

In summary, we have demonstrated that hydroxyurea is associated with a reduction in the levels of biomarkers of hypercoagulability in SCA patients. Our findings suggest a new clinical benefit for the use of hydroxyurea in SCA patients, beyond its traditional use. Future longitudinal prospective studies including a large number of patients and longer follow-up are needed to verify whether this biological effect of hydroxyurea may result in a decreased incidence of thrombotic complications in SCA patients.

Disclosure of Conflict of Interests

This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and INCT do Sangue.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Clinical and laboratory characteristics of the sickle cell anemia patients.

Table S2. Correlations of TF expression and levels of coagulation markers with hemolysis, endothelial activation, and inflammation markers.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- 1 Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91: 4216–23.
- 2 Solovey A, Gui L, Key NS, Heibel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 1899–904.
- 3 Ataga KI, Brittain JE, Desai P, May R, Jones S, Delaney J, Strayhorn D, Hinderliter A, Key NS. Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PLoS One* 2012; 7: e29786.
- 4 Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2202–9.
- 5 Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Olson RE. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease. *Am J Med* 2006; 119: 897.
- 6 Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Vama M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 2003; 289: 1645–51.
- 7 Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C, Cho MR, Christoph GW, Dover G, Ewenstein BM, Golan DE, Guttman CR, Hofrichter J, Mulkern RV, Zhang B, Eaton WA. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood* 1996; 88: 4701–10.
- 8 Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008; 93: 605–9.
- 9 Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, Patel DB, Jankowski MA, Pannell LK, Schechter AN, Rodgers GP. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2002; 116: 436–44.
- 10 Chanthathamachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang JG, Parise LV, Kirchhofer D, Key NS, Pawlinski R. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood* 2012; 120: 636–46.
- 11 Setty BN, Key NS, Rao AK, Gayen-Betal S, Krishnan S, Dampier CD, Stuart MJ. Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of hemolysis. *Br J Haematol* 2012; 157: 370–80.

More on: optimal dose for stroke thrombolysis in Asians

A. AHMAD and V. K. SHARMA

Division of Neurology, National University Hospital, Singapore

To cite this article: Ahmad A, Sharma VK. More on: optimal dose for stroke thrombolysis in Asians. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1970–1.

See also Chen C-H, Hsieh C-Y, Lai T-B, Chuang M-T, Chen W-L, Sun M-C. Optimal dose for stroke thrombolysis in Asians: low dose may have similar safety and efficacy as standard dose. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1270–1.

We read with interest the report by Chen *et al.* [1] regarding the comparable efficacy of a low (0.7 mg kg⁻¹ body weight) and a standard (0.9 mg kg⁻¹ body weight) dose of intravenous (i.v.) tissue plasminogen activator (tPA) in acute ischemic stroke. Their results are highly relevant in the Asian context where acute ischemic stroke accounts for about 3 million deaths

Correspondence: Vijay Sharma, 5 Lower Kent Ridge Road, National University Hospital, Singapore.
Tel.: +65 67722516; fax: +65 68723566.
E-mail: drvijay@singnet.com.sg

DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04836.x

Received 9 June 2012, accepted 18 June 2012

annually [2], often occurring at relatively younger ages when compared with the developed nations [3]. Furthermore, rapid improvements in health-care facilities and public awareness are continually increasing the rates of acute stroke thrombolysis.

Standard-dose tPA was chosen on the basis of a pilot dose-escalation study. The first study tested doses of 0.35 (*n* = 6), 0.60 (*n* = 12), 0.85 (*n* = 30), 0.95 (*n* = 25) and 1.08 (*n* = 1) mg kg⁻¹ within 90 min of symptom onset and demonstrated a higher proportion of major neurological improvement at 24 h in the 0.85 mg kg⁻¹ tier (55%) compared with the 0.6 mg kg⁻¹ tier (33%), with no symptomatic intracerebral hemorrhage (sICH) when a dose of less than 0.95 mg kg⁻¹ was used [4]. In the second study, tPA was used in patients presenting within 90–180 min after symptom-onset in variable doses of 0.6 (*n* = 8), 0.85 (*n* = 6) and 0.95 (*n* = 6) mg kg⁻¹ and observed